BRUKER *AVANCE* NMR

波譜儀基本原理與實驗使用手冊

BRUKER

BRUKER
BIOSPIN

目錄

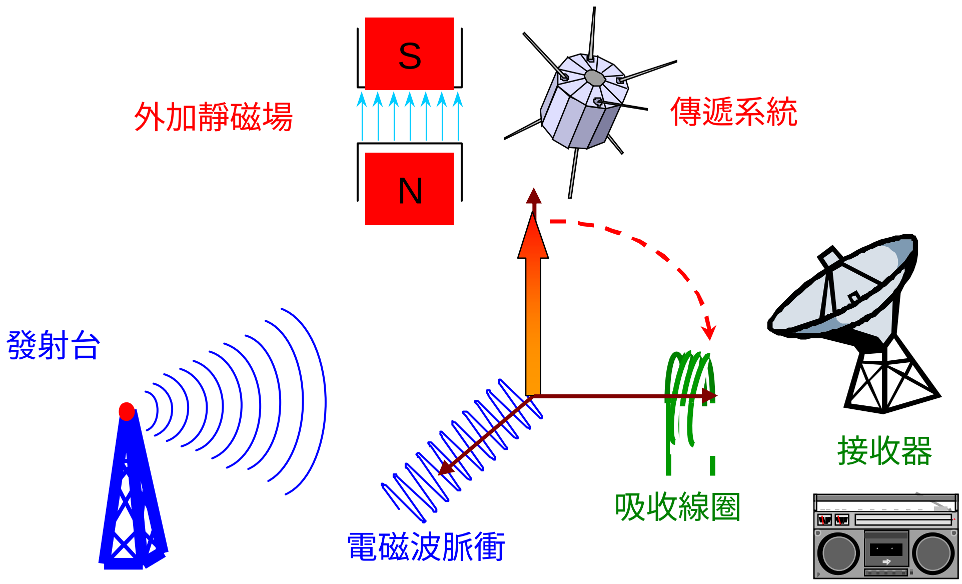
BRUKER *AVANCE* NMR 波譜儀基本原理與實驗使用手冊

第 I 部分：NMR 波譜學的基本原理

§1　原理簡介

核磁共振波譜學 (NMR spectroscopy) 是研究自旋角動量不為零的原子核所俱有的磁矩在置於外加靜磁場之下與電磁波脈衝 (以下簡稱為脈衝) 產生磁作用時的熱力學與動力學行為，以期對分子做分析、鑑定以及結構上的研究。

圖一是核磁共振實驗的示意圖。我們約略把核磁共振儀的組成分成三大部分：電磁波射頻部分 (脈衝)、超導磁鐵部分以及吸收線圈部分。其中電磁波射頻部分可以想像成電台的發射站，用來發射電磁波脈衝；超導磁鐵部分就相當於衛星中繼站，它會產生外加靜磁場以提供 NMR 實驗所需的環境；吸收線圈部分就像是我們所使用的收音機或是雷達接收站，可以接收來自 NMR 實驗的訊號並且將之放大。

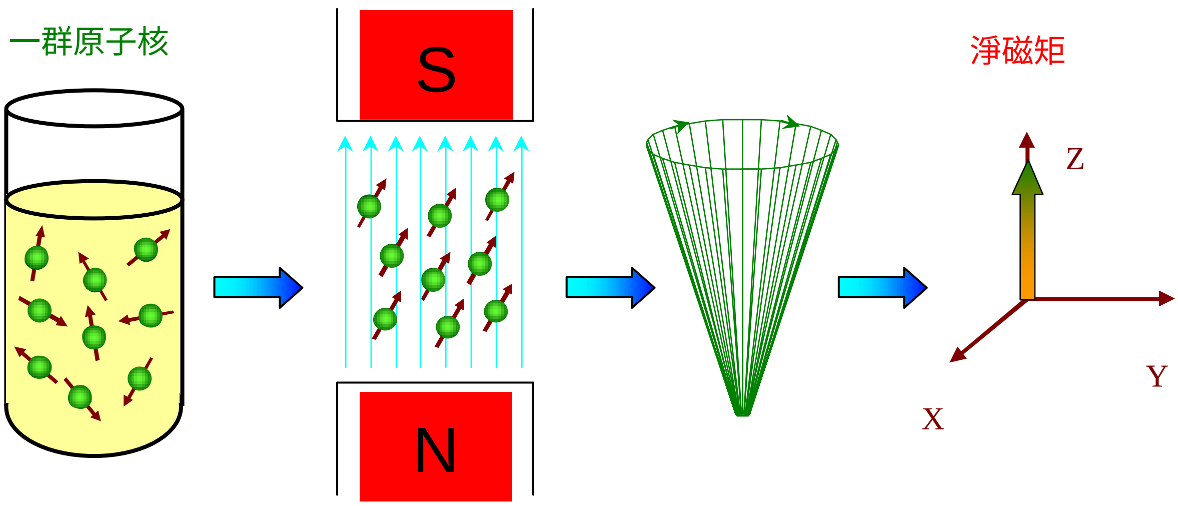


圖一：核磁共振示意圖。

磁矩 (Magnetisation)

當我們將自旋原子核置於超導磁鐵所產生的外加強大靜磁場 B_0 時 (通常靜磁場方向定為 +Z 軸)，它們會在 Z 方向對應到某些特定的量子化方向，而這些不同的方向都會分別對應到不連續且能量特定的能階。原子核磁矩與外加靜磁場同向者會對應至較低能量的能階；反之，與外加靜磁場反向的原子核磁矩會對應至較高能量的能階。在熱平衡狀態時 (亦即符合 Boltzmann 分布條件時)，位於較低能階的原子核分布 (population)

會稍微超出位於較高能階的原子核分布而造成在 +Z 方向淨磁矩的產生 (圖二)。

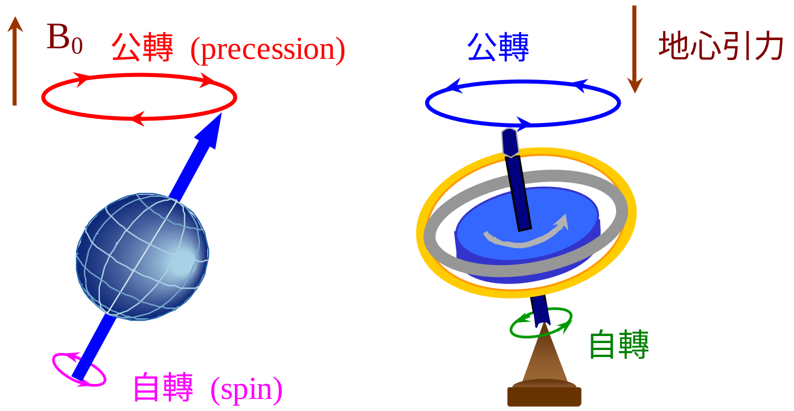


圖二：樣品管內原子核於外加靜磁場下產生 +Z 方向淨磁矩的示意圖。

由於外加靜磁場所造成的高低能階差的能量僅僅落在電磁波 (radiofrequency，RF) 的頻率範圍，因此以能量而言核磁共振是一般光譜分析儀器中能量最低且最安全的 (地球的平均磁場強度約為 0.5 Gauss；NMR 的安全範圍是 5 Gauss；而像電冰箱的馬達可產生 50 Gauss 左右的磁場強度)。由於高低能階上原子核的分布數目差異依 high-temperature approximation 是與能階差的大小成正比，而訊號的強弱與高低能階上原子核的分布數目差異成正比，因此核磁共振的訊號強度是非常微弱的。舉例來說：在外加靜磁場存在下而造成氫原子核的旋進頻率為 400 MHz 時 (相當於 9.39 Tesla 的靜磁場強度)，如果在低能階上有一百萬個氫原子核的話，則在高能階上約有 999948 個氫原子核。這十萬分之一左右的氫原子核分布差異就是氫譜訊號的來源。

Larmor 旋進 (Larmor precession)

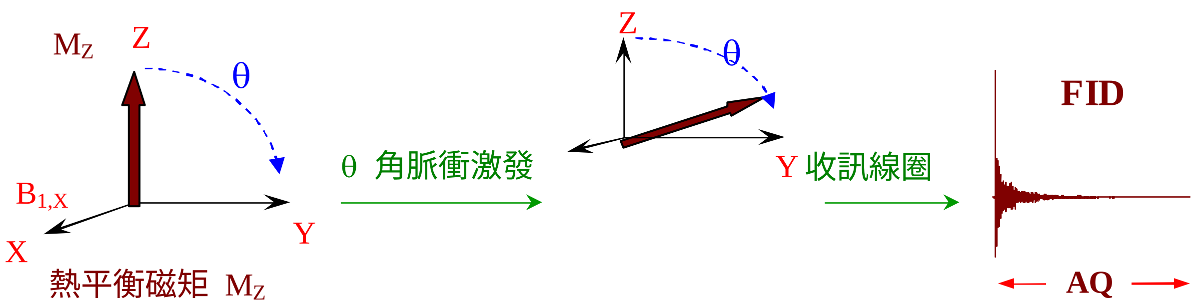
自旋的原子核本身俱有磁矩，而這些磁矩在受到固定外加靜磁場作用時所產生的磁轉矩 (magnetic torque) 作用就會造成原子核穩定的旋進 (precession)。如果我們把原子核的自旋視為自轉的話，則原子核的旋進行為就好比是公轉。這樣的情況可以比擬成小時後所玩的雷達 (圖三)。此旋進頻率 ω_0 (即所謂的 Larmor 頻率) 的大小會相當於外加靜磁場強度 B_0 與代表原子核身份證的 γ 值的乘積：$\omega_0 = \gamma \cdot B_0$。



圖三：(左) 原子核本身自轉以及外加靜磁場造成公轉的示意圖；(右) 外力造成雷達的自轉以及地心引力造成雷達的公轉示意圖。

自由感應衰退 (<u>F</u>ree <u>I</u>nduction <u>D</u>ecay，FID)

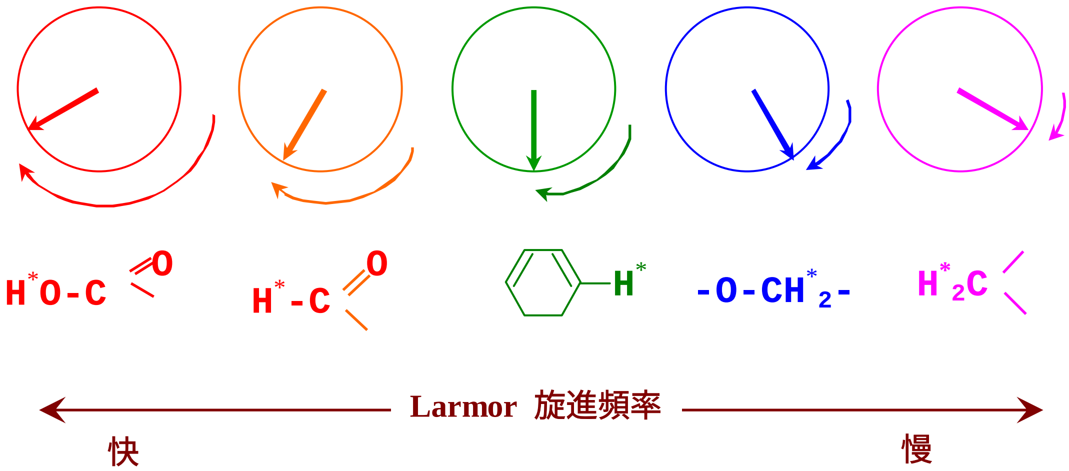
如果此時在垂直於外加靜磁場的方向 (譬如說 X 方向) 施以與 Larmor 頻率及相位相當的電磁波脈衝，則會使淨磁矩受磁轉矩作用而旋轉至 XY 平面上 (稱之為脈衝激發)。此 XY 分量上的磁矩在吸收線圈 (receiver coil) 上所產生的感應電壓會形成隨時間增加而強度減少的 NMR 時域訊號 (time domain signal)，這個時域訊號經過放大以及過濾之後就是 NMR 訊號的來源, 稱之為自由感應衰退 (<u>F</u>ree <u>I</u>nduction <u>D</u>ecay, 簡稱為 FID)。原子核磁矩受外加電磁波脈衝激發後產生 FID 的形成示意圖如圖四所示。



圖四：原子核磁矩受外加電磁波脈衝後形成 FID 的示意圖。

化學位移 (Chemical shift，δ)

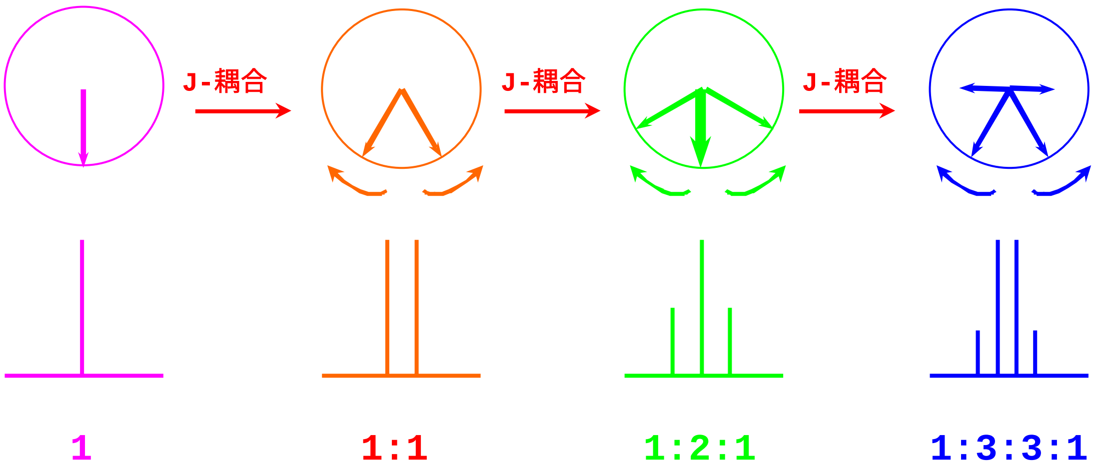
雖然 NMR 波譜儀所測量的是原子核本身，但是頻譜訊號上所顯示的 Larmor 共振頻率分布情形會與原子核外圍的電子雲狀態有關，而電子雲密度也會對應到原子核間的排列組合 (亦即分子結構)。因此，分析 NMR 圖譜可以獲得整個分子的資訊。首先，不同官能基上的原子核旋進頻率會對應到特定的頻率位置，這一類的旋進頻率稱之為化學位移，它是 NMR 頻譜中鑑定官能基種類的重要資訊之一 (圖五)。



圖五：不同官能基上的氫原子核在 NMR 頻譜上表現出不同的 Larmor 旋進頻率。

J-耦合 (J-coupling)

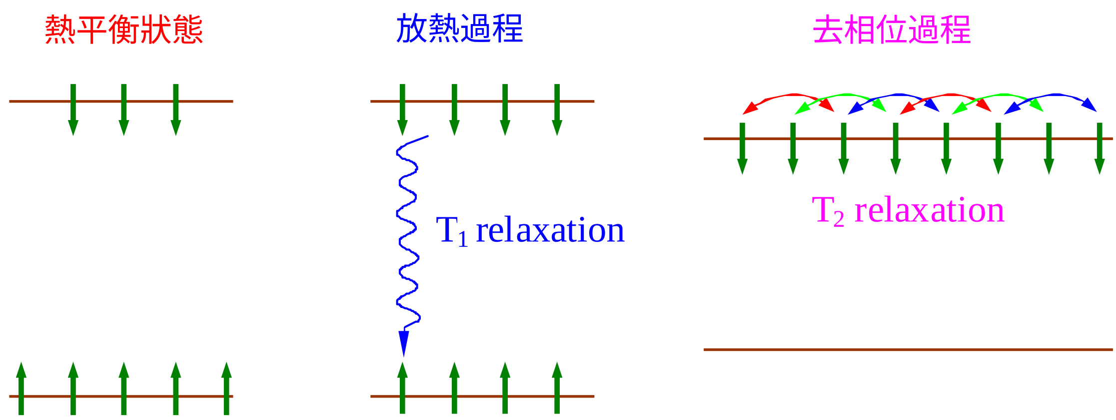
其次，除了化學位移決定了不同官能基在 NMR 頻譜圖上的位置之外，原子核與原子核之間透過化學鍵的 J-耦合 (J-coupling) 磁作用會使得先前原子核的旋進頻率分裂成以原來頻率為中心而頻率差值為 J Hz 的多重吸收峰 (multiplet)。由 J-耦合 所造成頻譜的分裂結構可提供分析頻譜時不同原子核之間相聯接的資訊。在各耦合作用的耦合常數 J_1、J_2、J_3… 相近的情形之下，則多重吸收峰的分裂模式可以用二項式的係數 (也就是所謂的 Pascal’s triangle) 予以表示 (圖六)。



圖六：原子核之間藉由 J-耦合作用而形成多重峰的示意圖。

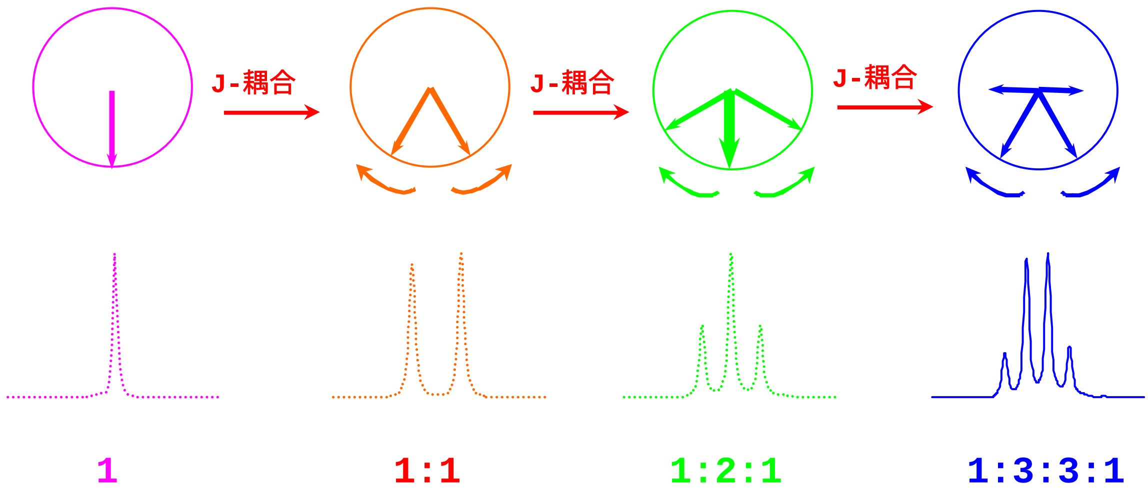
弛豫 (Relaxation，T_1/T_2)

第三點，原子核從激發狀態回復到熱平衡狀態的過程我們稱之為弛豫 (relaxation)。在只有外加靜磁場存在而沒有其它外界因素影響之下，藉由弛豫的過程系統最終會回復到符合 Boltzmann 分布的熱平衡狀態。NMR 波譜學家將弛豫過程主要分成二種類型。第一種類型稱之為 “自旋–晶格” 弛豫 (spin-lattice relaxation) 或通稱為 “T_1” 弛豫。所謂的晶格指的是圍繞在原子核外圍的所有其它原子或分子。這種方式的弛豫使得位於高能階的原子核將輻射能量以熱能的方式釋放至晶格上而回到低能階上。第二種類型的弛豫稱之為 “自旋–自旋” 弛豫 (spin-spin relaxation) 或通稱為 “T_2” 弛豫。這種形式的弛豫是一群位於高能階的 “等色原子核” (isochromat) 彼此之間的去相位 (dephase) 過程 (亂度方面的考量) 而與能量的傳遞完全無關。因此當原子核吸收電磁波脈衝能量後，原子核會從較低的能階躍遷至較高的能階，然後再依照上述兩種弛豫方式回到較低的能階而最終達到熱平衡狀態 (圖七)。



圖七：(左) 符合 Boltzmann 分布條件下的熱平衡狀態；(中) 高能階上的原子核經由放熱方式的 “自旋-晶格” 弛豫；(右) 高能階上的原子核藉由去相位方式的 “自旋-自旋” 弛豫。

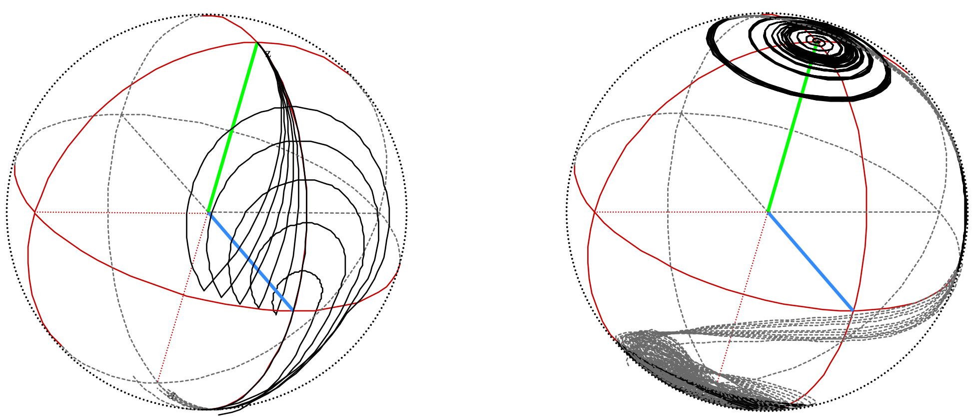
在理想狀況下，NMR 訊號的譜線寬度與 T_2 弛豫成 $\Delta\nu_{1/2} = 1/(\pi T_2)$ 的數學關係式 [此處 $\Delta\nu_{1/2}$ 是譜線的半高全寬值 (Half-Height Full-Width，HHFW)，其單位是 Hz；T_2 的單位是秒]。由於此無可避免的弛豫行為，所以 NMR 訊號具有譜線寬度的現象於焉產生 (圖八)。



圖八：一個虛擬的 AX_3 自旋系統。原子核 A 因為三次的 J_{AX} 耦合而由左至右的逐漸分裂成 1:3:3:1 的多重吸收訊號。此處加入弛豫的概念，所以訊號具有譜線寬度 (linewidth)。

去耦合 (Decoupling，Ξ)

最後一個重要的觀念是去耦合。所謂 “去耦合” 指的是利用脈衝技術使 J-耦合 的平均效果 “$J_{residual}$” 為零 (而不是使耦合常數 J = 0)。其做法是將與之有耦合作用的原子核予以快速而重覆地執行 180° 脈衝。前面曾提到 NMR 的訊號是極其微弱的，所以在平常一維頻譜的 NMR 實驗中，對於靈敏度不大的原子核是希望訊號的高度不要受到 J-耦合的分裂而降低；再者，在一般的二維頻譜實驗中，通常的目的是要得到兩原子核在化學位移之間的耦合關係而已。所以消除 J-耦合作用的去耦合脈衝技術也是 NMR 波譜儀實驗上不可或缺的重點。圖九是兩種去耦合脈衝示意圖。



圖九：(左) 類似 WALTZ-16 方式的寬頻 (broadband) 組合式去耦合脈衝 (Composite Pulse Decoupling，CPD)；(右) 絕熱式 (adiabatic) WURST 超寬頻組合式去耦合脈衝。

依照 “figure of merit” 的定義：$\Xi = 2\pi\Delta F/\gamma B_2$ (ΔF 為去耦合脈衝所涵蓋的頻率範圍)，則 CW decoupling、pseudorandom phase inversion 以及 homonuclear decoupling 皆可視為 low figure of merit 的去耦合方式，其涵蓋的有效頻率區間約在 10 ~ 100 Hz。而常用的 MLEV、WALTZ-16、GARP-1、DIPSI-2 … 則屬於寬頻式去耦合脈衝 (broadband decoupling)，其特性如表一所示。至於可適用於超高磁場 (≥ 17.62 Tesla 或 ≥ 750 MHz) 中的 WURST、Vega、smooth Chirp 則統稱為超寬頻式去耦合脈衝 (ultra-broadband decoupling)，其有效涵蓋頻率範圍甚至於可達 300 KHz 以滿足日後靜磁場強度為 23.5 Tesla (相當於氫原子核的 1 GHz) 的情形。

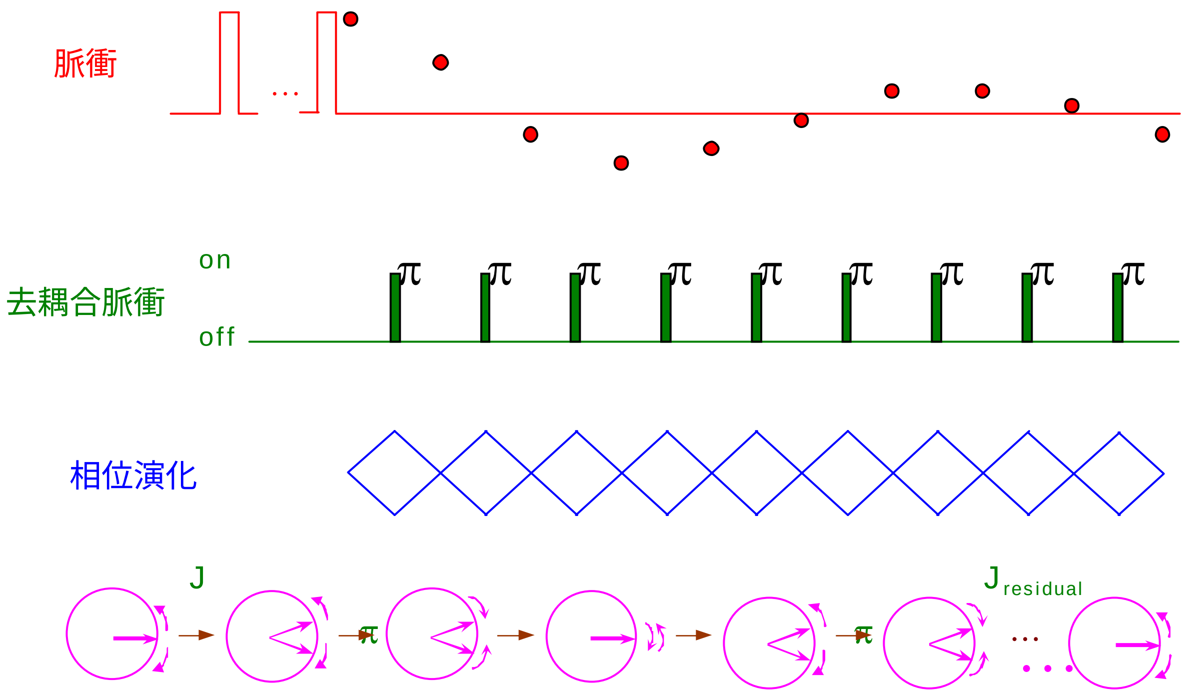
去耦合方式	Residual splitting for J = 150 Hz	Figure of merit	有效頻率涵蓋範圍
MLEV	0.6 Hz	1.5	~ 7000 Hz
WALTZ-16	< 0.2 Hz	1.8	~ 4500 Hz
GARP-1	0.3 Hz	4.8	~ 18500 Hz
DIPSI-2	< 0.1 Hz	1.2	~ 3000 Hz

表一：常用的寬頻組合式去耦合脈衝 (CPD) 特性表。

以下我們簡述其中兩種應用於 BRUKER NMR 波譜實驗的去耦合方式。

❁ 同核種去耦合 (Homonuclear decoupling)

此處我們以 **zghd** 脈衝程式為例，它是在收集訊號的同時執行去耦合作用的同核種去耦合方式 (圖十)。假設我們已經得到在高強度脈衝下的實驗條件如下所述：PL1 = 3 dB，P1 = 10 μsec，$^3J_{HH} = 10$ Hz。因此我們可以計算出此高強度脈衝的激發速率為 $\gamma B_1 \cong 25$ KHz。為了要使去耦合作用成功 (也就是說經過去耦合作用後，其在頻譜上殘留的耦合分裂會小到不可察覺的程度)，其對應在低強度脈衝下對應的去耦合實驗參數設定值約 $\gamma B_2 > 4\pi J \cong 125$ Hz。所以我們得到激發脈衝激發速率 γB_1 與去耦合脈衝激發速率 γB_2 之間的比值為： $\gamma B_1/\gamma B_2 \cong 200$。



圖十：同核種去耦合實驗的示意圖。此圖顯示，去耦合脈衝是在每兩個取樣點的中間執行 180° 的脈衝。

依照分貝 (dB) 的定義：相對強度差值 Δ dB = 20 log(γB_1/ γB_2)，我們可以算出 γB_1 與 γB_2 的分貝數差異約為 46 dB。所以說，為了要滿足的 10 Hz 的去耦合作用，此去耦合脈衝強度的分貝值應該是 (3 + 46) = 49 (dB)。

一般而言，大部分探頭的高強度 90° 脈衝的強度值會落在 –6 到 4 dB 之間。因此，依上述計算結果我們就可推測此時的同核種去耦合脈衝強度值應該設在 40 到 50 dB 之間。而如果在大多數的 氫–氫 耦合常數平均值在 $<^3J_{HH}> \approx 5$ Hz 的情形下，則可先推測此時應用的同核種去耦合脈衝強度值在 50 到 60 dB 之間。

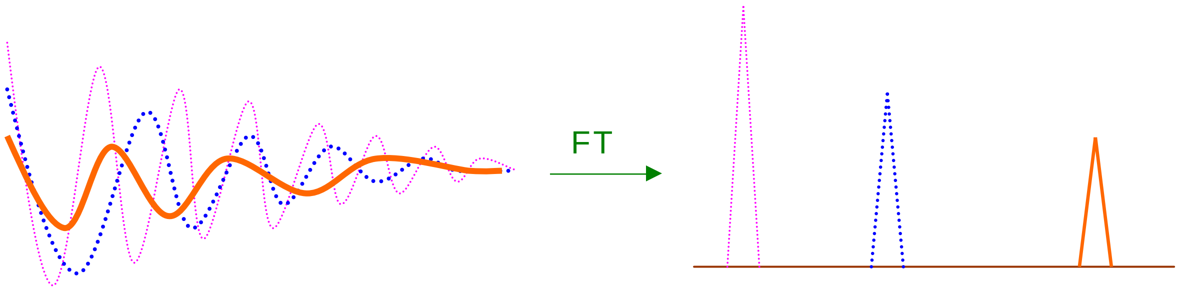
寬頻式去耦合脈衝 (Broadband decoupling)

BRUKER 使用的寬頻式去耦合脈衝為 “組合式去耦合脈衝” (Composite Pulse Decoupling，簡稱為 CPD)，而現今的寬頻式去耦合脈衝實驗皆以組合式去耦合脈衝於收訊時執行較大頻率範圍的去耦合作用。組合式去耦合脈衝其在設計時已考慮了在頻率空間上 “均勻” 激發的概念 (flat-top excitation)，所以一般在校正時比較重要的是其脈衝強度與脈衝時間。配合 figure of merit 的計算，可以發現一般在化學上的應用會使用

WALTZ-16 的單一 90° 脈衝時間在 80 ~ 100 usec 左右；而 GARP-1 的單一 90° 脈衝時間應在 60 ~ 80 usec 之間。

Fourier 轉換 (Fourier transform)

Fourier 轉換 (Fourier transform，FT) 的技術 (圖十一) 是將時域訊號 (time-domain signal) 的 FID 映照至我們易於分析的頻域訊號 (frequency-domain signal) 頻譜。這是因為我們不易辨識時域訊號中訊號迴響 (echo) 的意義，而轉換至頻域訊號的資訊後由於不同頻率之間的 Fourier 轉換是互相正交的 (orthogonal)，因此方便以後的分析。所以在頻域訊號中 (也就是頻譜) 每一個不同化學位移值上的訊號及其強度都會準確的對應至特定的原子核，在數學的處理上不會有混淆的情形發生。

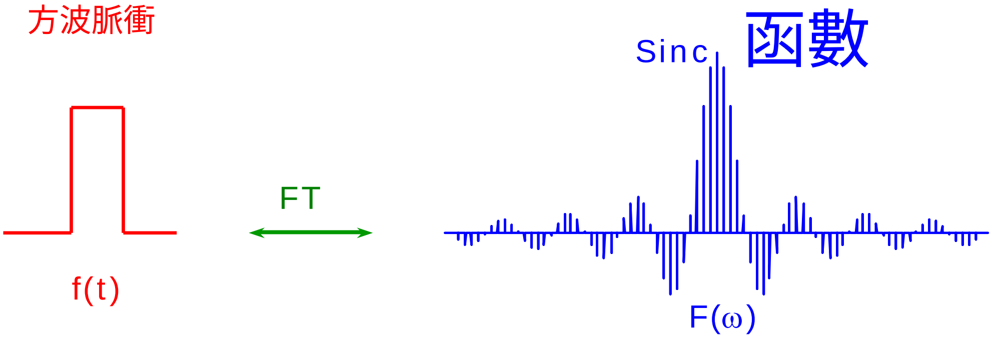


圖十一：經 Fourier 轉換後左方 FID 中不同頻率與強度的振盪訊號會在其右方對應的頻率位置上出現。

連續波 (Continuous Wave，CW) 與脈衝式 (Pulsed) NMR

早期的 NMR 儀器設計是固定射頻頻率而逐漸改變外加靜磁場強度。在不同化學環境下，不同官能基上的原子核會有不同的旋進頻率。當磁場強度改變時旋進頻率會隨之改變，而射頻與旋進頻率一致時就會產生共振訊號。這一種的設計模式我們稱之為連續波 (Continuous Wave，CW) NMR，它會直接得到頻域 (frequency domain) 的圖譜，其缺點是靈敏度低。

目前常用 NMR 波譜儀的設計是利用一個時間短且強度大的電磁波脈衝來激發原子核，所以可同時激發一個大範圍旋進頻率下的所有原子核。這一類的設計稱之為脈衝式 NMR (pulsed NMR)。依照數學上的轉換關係式，一個所謂的方波脈衝 (square pulse) 其激發的頻率範圍類似一個 sinc 函數 (圖十二)，並且在 95% 高度所涵蓋的頻率範圍符合 $\Delta t \cdot \Delta\omega_{95\%} \cong 350$ (其中 Δt 的時間單位是 usec 而 $\Delta\omega$ 的頻率單位是 KHz)。所以一般的 10 usec 方波脈衝可以 “均勻” 激發約 35 KHz 的頻率範圍，大致上可滿足實驗的需要。



圖十二：方波脈衝的時間函數 f(t) 與其對應的頻率 F(ω) 涵蓋範圍示意圖。

激發後，磁矩於弛豫的過程中就會在接收線圈上產生一個自由感應衰退的時域訊號。在等待一段時間後啟動第二個方波脈衝則會產生第二個 FID。這第二個所得的 FID 訊號會累加到第一個 FID 上。這樣的過程可以一直重覆執行直到達到滿意的訊雜比為止。由於靈敏度上的增加、時間上的易於控制以及可設計不同的脈衝程序來滿足特殊的需要 (例如：多量子項)，脈衝式 NMR 已完全成為 NMR 波譜儀的主流。

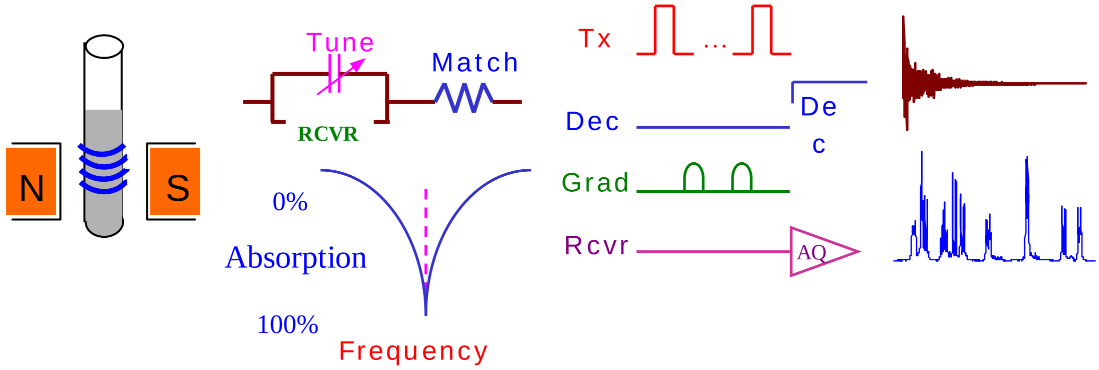
結語 (A comment to NMR)

NMR 的效果十分微弱，這是其缺點也可以是其優點。譬如說我們可以設計各式各樣的脈衝實驗技術來獲得經由化學鍵傳遞的原子核之間的 J-耦合作用 (through-bond J-coupling) 或是經由空間傳遞的原子核之間的偶極矩作用 (through-space dipolar interaction) 的資訊，進而直接或間接的推測分子的幾何結構以及其化性與物性。我們也可以利用多量子 (multiple-quantum) 的機制來簡化圖譜的複雜性並強調某些特定的作用。脈衝式磁場梯度的利用更提供迅速且靈敏度較高的實驗。此外，基於高低能階原子核分布的差異是 NMR 脈衝激發訊號的來源，因此只要能增加低能階與高能階原子核分布的差值就可以增加 NMR 訊號的靈敏度。像一般我們使用較高的外加靜磁場強度、利用透過空間傳遞的 NOE 效應 (NOE effect) 或是經由化學鍵傳遞的 J-耦合 (諸如 DEPT、INEPT、ATP…) 效應等技術就是基於這個道理來提高訊號的靈敏度。必須要鄭重強調的是，NMR 雖然 powerful 卻非 almighty。實驗的成敗與否仍有賴使用者對其樣品以及 NMR 技術的瞭解，如此才能使用適當的實驗方法取得充分且滿意的資訊。

§2 BRUKER *AVANCE* NMR 波譜儀實驗邏輯

在這一節中，主要是描述實際上執行實驗的一些基本觀念並將針對如何依樣品的特性來設定所需的參數值。我們將依照圖十三的步驟，作為執行 BRUKER *AVANCE* NMR 波譜儀實驗的引導。

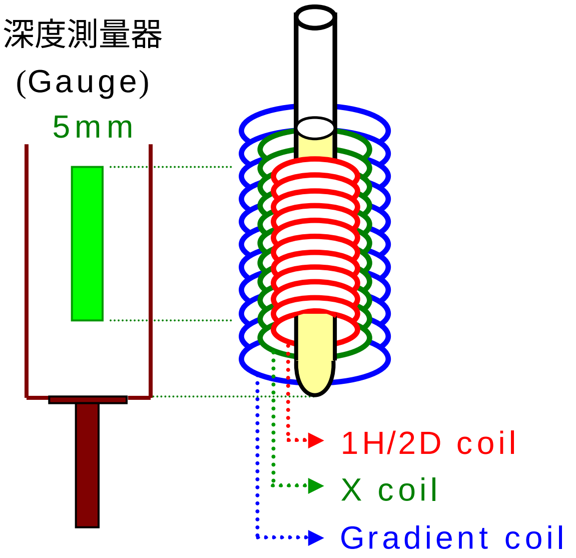
步驟一：Sample Allocation & Thermal Equilibrium　步驟二：Hardware/Sample Adjustment　步驟三：Data Acquisition　步驟四：Data Processing & Plotting



圖十三： 執行 BRUKER *AVANCE* NMR 實驗的四個步驟邏輯示意圖。自左至右依序為：步驟一是置換成待測的樣品管；步驟二是去調整硬體與樣品的匹配性；步驟三為設定適當的脈衝程序與實驗參數值；最後的步驟是將所獲得的 FID 訊號予以轉換成為頻率圖譜並予以畫出。

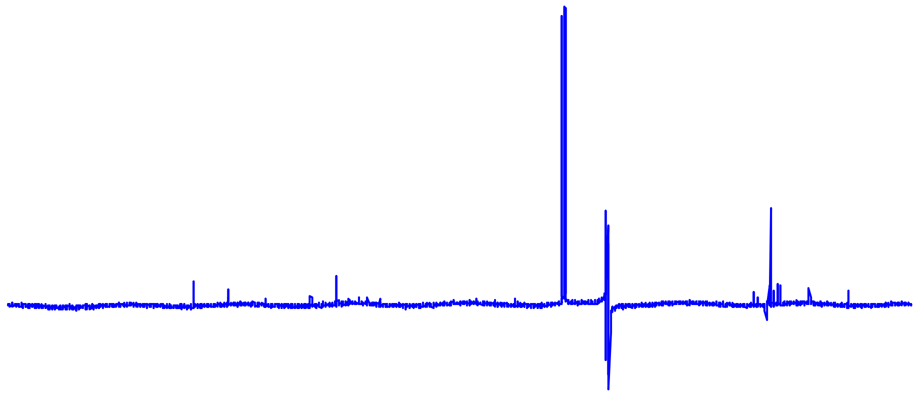
步驟一：樣品的準備

對於平常的一維碳/氫譜實驗，只需使用一般的 5mm 樣品管並且填充約 0.5 ~ 0.55 ml 的量，再將樣品管放入 spinner 中並以深度測量管 (gauge) 予以調整樣品管的深度即完成步驟一的大致程序了 (圖十四)。



圖十四： 樣品管放入深度測量器中調整深度。視樣品管內的高度來調整樣品管的深度，使樣品管內的溶液位於深度測量器內標線的中央處。

如果要執行的是較為複雜或是敏感的實驗時，應選用材質較好的樣品管並且將實驗環境予以做恆溫的處理。需要提醒一點的是，樣品管內的溶液不可太多並且 RG 值不可太大 (RG ≤ 8k) ，以免 FID 取樣點的第一及第二點被影響而造成頻譜基線的扭曲 (rolling base) (圖十五)。相反的，如果樣品的量太少則應考慮使用特殊設計的樣品管 (譬如說 SHIGEMI tube)。



圖十五： 由於樣品管內的溶液過高或是 RG 值太大時，造成 FID 取樣點的第一及第二點被影響而使頻譜有基線扭曲的情形。

步驟二：調整 NMR 波譜儀硬體與樣品之匹配性

步驟二分成兩個部分：調整共振頻率與調整系統的阻抗 (impedance)。BRUKER 總稱步驟二為 WOBBLE。前一個部分稱為 Tune，此步驟調整電磁波脈衝的射頻頻率使之成為共振吸收頻率；後一個部分稱為 Match，用以調整系統的阻抗，使得激發至樣品的能量可以儘量被吸收而減少反射回來的成份。一般而言，當溶劑的介電常數不大或是極性不大時，WOBBLE 對實驗的影響並不明顯。但是如果溶劑的極性較大時 (譬如說以水作溶劑) 或是實驗需要準確的 90°/180° 脈衝激發時，則 WOBBLE 的動作不可忽略。

步驟三：實驗資料之取得

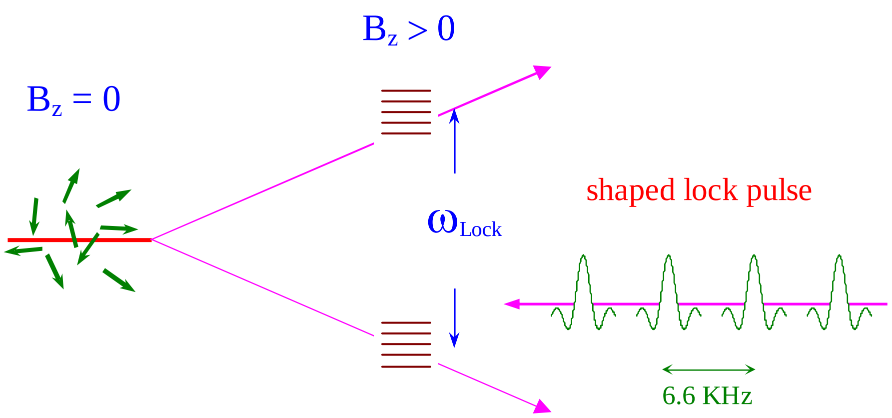
此步驟是 NMR 實驗的核心部分，對實驗有絕對的影響。大致上可區分為氘鎖定 (deuterium lock)、勻場 (shimming)、讀取參數檔 (<u>r</u>ead <u>par</u>meter，*rpar*)、以及執行實驗 (*zg*/*go*/*gs*) 四個部分。以下我們依序介紹各個步驟的細節以及常用的參數意義。

❁ 氘鎖定 (Deuterium lock)

氘鎖定是用來保持磁場長時間穩定的技術。它的基本觀念是監控溶劑中的氘訊號並

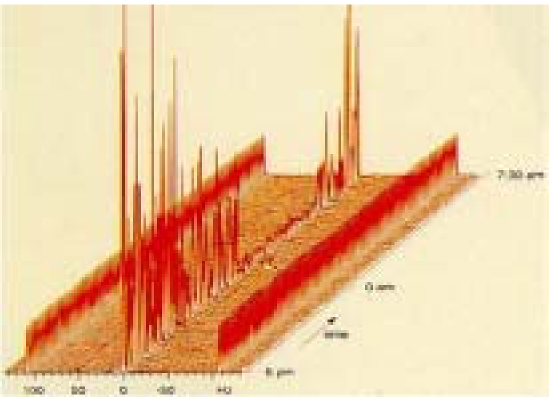
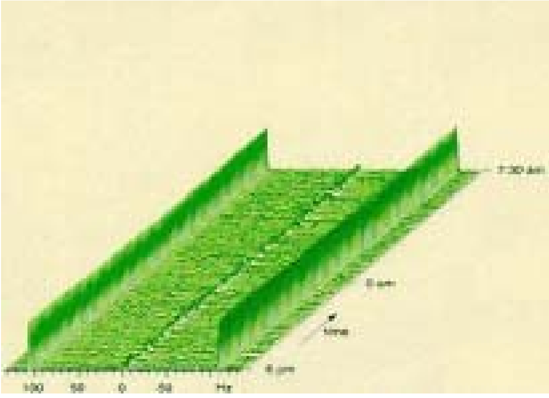
調整鎖定頻率 (lock frequency) 的載頻 (carrier frequency)，以期讓訊號保持在鎖定頻率之下而保持磁場的穩定。在使用氘鎖定時有三個主要的參數要考慮：第一個是用來激發氘原子核的發射器鎖定能量 (lock power)。假如鎖定能量太大的話，會產生飽和 (saturation) 的現象。飽和現象發生時會造成譜線變寬以及鎖定訊號振幅的上下振盪，因而破壞鎖定的品質。理想上希望能夠將鎖定能量調至剛好低於飽和能量的狀態，也就是將鎖定訊號高度調至最大。為達到這個目的，可以將鎖定能量先調至飽和 (鎖定訊號會忽高忽低)，之後再將鎖定能量稍往下調一些 (約 3 dB)，使鎖定訊號達到一個高標準值。

第二個參數稱為鎖定增益 (lock gain)。使用較大的增益值會造成鎖定的氘訊號放大，但同時也會放大雜訊。最後一個參數是鎖定相位 (lock phase)，可以命令電腦自行調整或是以手動的方式予以調整。只有在鎖定相位正確之下氘鎖定才會穩定。BRUKER 採用數位式氘鎖定 (digital deuterium lock) (圖十六)，對於長時間實驗的穩定性特別重要。



圖十六： BRUKER 數位化式氘鎖定的示意圖。BRUKER 採用造型波 (shaped pulse) 的方式，針對溶劑中特定的氘訊號予以激發出特定的鎖定頻率 ω_{Lock}，如此可得到最佳的氘鎖定效果。

BRUKER 的數位式氘鎖定中，只要先鍵入 *lock* 指令並選擇溶劑種類，則系統會自動選擇出符合在該固定磁場強度之下的指定氘溶劑的特殊頻率來做氘鎖定，所以對氘鎖定特別的靈敏。對於複雜的生化樣品執行多維譜實驗時，頻譜的解析度會決定實驗的成功與否。而一些常存在於多維譜的 t_1 雜訊 (t_1 noise)，也可以藉由數位化頻率鎖定得以降低。BRUKER 數位化式的氘鎖定與傳統的氘鎖定實驗的比較圖可參考圖十七。

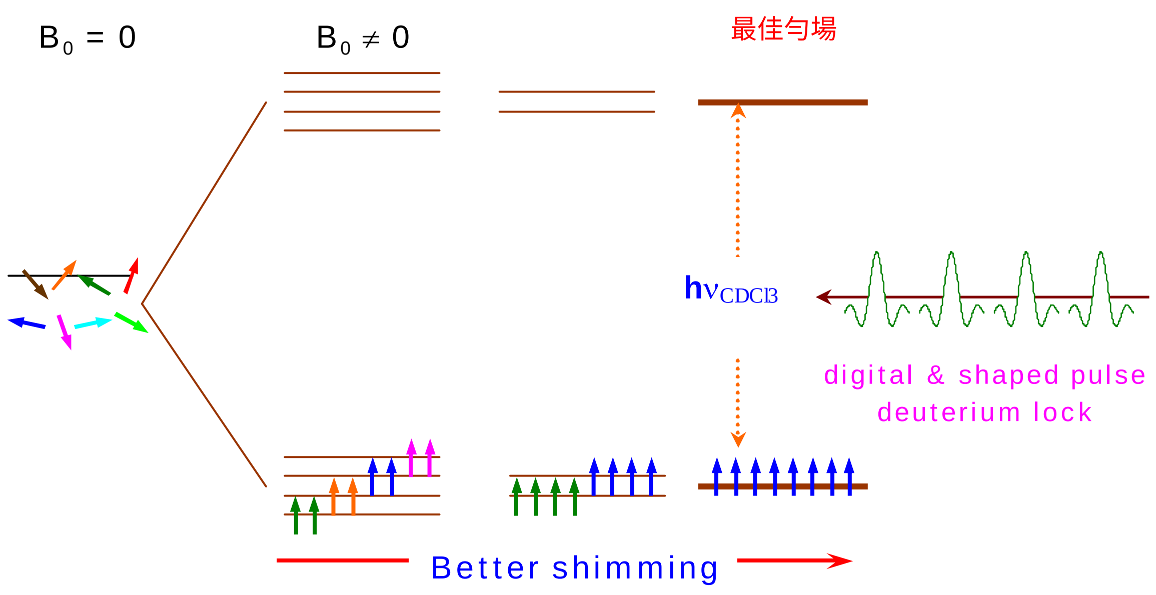
圖十七：(左) 傳統式的氘鎖定方法。此圖表示了傳統的 “類比式” 氘鎖定的實驗結果。由右方的時間軸可以看出，在凌晨時由於車輛並未經過，因此可以把中央不必要的 $^{1}H\{^{12}C\}$ 訊號強度壓抑至兩翼 $^{1}H\{^{13}C\}$ 訊號的 30% 以下；而在白天時，兩翼之衛星訊號則小於中央的訊號。(右) BRUKER 的 “數位式” 氘鎖定方法。此圖顯示了由於 BRUKER 採用數位化及造型波脈衝的氘鎖定方式，造成磁場的穩定性大幅提昇。由實驗結果顯示，不論是白天或是凌晨，中央 $^{1}H\{^{12}C\}$ 訊號的強度總低於兩翼 $^{1}H\{^{13}C\}$ 衛星訊號強度的 25%。

勻場 (Shimming)

No shimming no NMR 是 NMR 機械工程師的口頭禪。而事實上，為了要取得高解析度的 NMR 頻譜，則必定要保持非常均勻且穩定的磁場不可。

除了由超導磁鐵所產生的靜磁場外，NMR 波譜儀還含有一組 “印刷線圈” (printed coil) 圍繞在磁鐵的外圍以產生可微調的磁場。這個磁場可用來抵消外加靜磁場的不均勻度，使磁場達到較均勻的狀況。調整磁場使之更均勻的過程稱之為 “勻場” (shimming)。當我們做實驗時一定要勻場才能得到高品質的頻譜。在超導磁鐵中，有一組超導勻場線圈 (cryoshim coil)。這一組線圈在 NMR 裝機時已調整好。在超導勻場線圈外圍還有一組 “室溫勻場線圈” (room temperature shim coil)。對不同的樣品做測試時，使用者就必須調整這一組線圈。由於超導磁鐵的外加磁場定在 +Z 方向，所以在勻場的時候與外加靜磁場平行的 Z 及 Z2 方向的勻場是最重要的。這是因為旋轉樣品時，樣品乃依 Z 軸旋轉，所以在 X 及 Y 方向的磁場不均勻度會因旋轉而減弱其效應。Z 方向的磁場均勻度可以調整 Z、Z2、Z3、Z4 及 Z5 來改善之。學術上我們對 Z 方向的磁場調整稱之為軸勻場 (axial shim、zonal shim 或 on-axis shim)；而 X、Y 方向的磁場調整稱之為徑勻場 (radial shim、tesseral shim 或 off-axis shim)。

BRUKER 設計的勻場系統稱之為正交式勻場系統 (orthogonal shim system)。比起非正交式的勻場系統而言，正交式勻場系統的各勻場方向的相互影響是最小的。然而在實際勻場時仍須注意各不同方向的磁場仍有少許的互相影響。例如說我們調整某一個方向的磁場梯度而達到最均勻的勻場情況時，但是只要調整另一個勻場方向就會稍微影響到原來調好的磁場均勻度。所以勻場是相當複雜的過程。由於在這當中有幾組勻場是彼此影響比較大的，因此可簡化勻場的過程。在勻場時一個很重要的觀念就是找到一組可以讓鎖定水平 (lock level) 達到最高的情況。當勻場的動作愈理想時，高低能階的能量不準度會因此減少 (圖十八)，如此一來所提供固定的氘鎖定頻率 ω_{CDCl3} (假設溶劑是 $CDCl_3$) 更可有效的造成氘原子核的激發而使鎖定水平增高。通常我們是先調整 Z 方向的勻場讓鎖定水平升到最高，然後再調整 Z2 方向。要記住 Z2 是往正的方向還是負的方向，然後再調整 Z 至最高點。之後再回到 Z2 方向並依前面所調的反方向調整，以及再調整 Z 方向達到最大強度。不斷重覆這個過程就可以得到最好的 Z 及 Z2 勻場值設定。



圖十八：勻場與氘鎖定水平高度的關係圖。

通常我們很少去改變 Z3、Z4 和 X、Y、XZ、YZ、XY、X2–Y2 … 的勻場值。調整 Z 與 Z3 的勻場會改變對稱性譜線的均勻度；而改變 Z2 與 Z4 會改變非對稱性譜線的均勻度。一般在做實驗時，調整 Z 與 Z2 方向的勻場就已足夠了。由於鎖定訊號是從氘溶劑來的，所以鎖定訊號僅代表氘訊號強度的大小，並非真正反映到實驗時的譜線形狀 (lineshape)。最好的方式是去觀察實驗結果的自由感應衰退 (Free Induction Decay，

FID) 訊號來調整磁場的均勻度。一般而言我們是調整勻場使自由感度衰退愈延長越好並且讓面積越大越好，這樣就可兼顧譜線形狀和頻譜的解析度。

勻場的技巧上一直是使用所謂的 “Simplex” 技術。近年來 BRUKER 發展出一套與探頭有關的磁場梯度勻場技術 (gradient shimming)。Gradient shimming 是利用 gradient echo 實驗中兩個不同 echo time 之下的訊號強度差來偵測各不同方向的勻場線圈對磁場均勻度的貢獻。藉由多次改變各不同方向的勻場線圈值及觀察 gradient echo 的強度，可以將這些資訊轉換成其在相位上的效應 (i.e. phase map) 並一一進行勻場值的修正。這種方式的勻場技巧十分的迅速有效，一般在 Z ~ Z5 方向的勻場只需花費 3 分鐘內的時間即可對水溶液樣品予以勻場完畢並獲得十分滿意的頻譜。不同的氘溶劑可配合不同的勻場設定來完成之。

讀取參數檔 (read parameter，*rpar*)

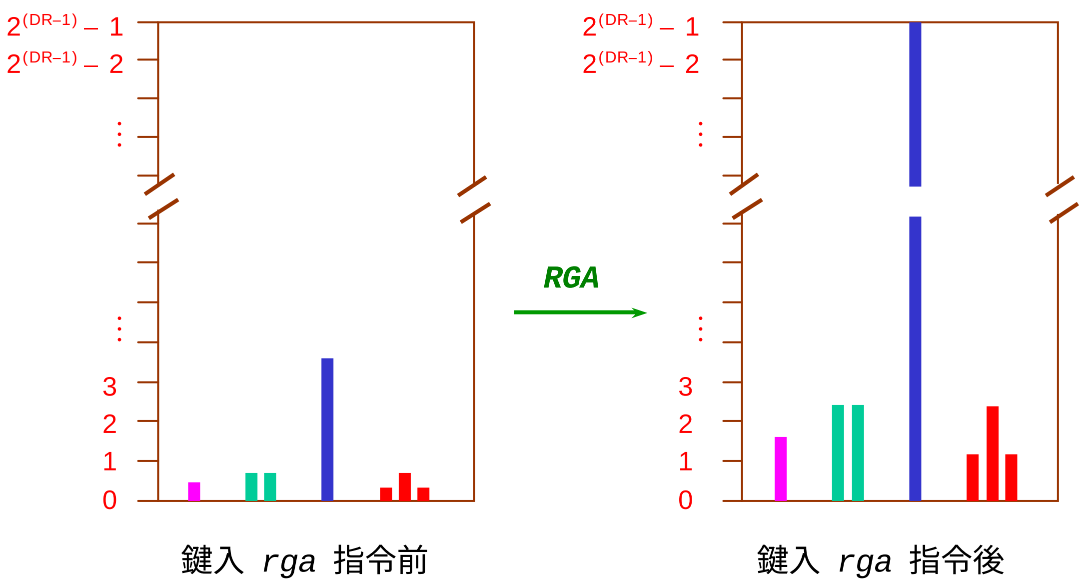
參數檔部分中包含了收訊參數 (acquisition parameters)、訊號處理參數 (data processing parameters)、繪圖參數 (plotting parameters)、以及資料輸出參數 (output parameters) 部分。在讀取收訊參數檔部分中，為了便於記憶以及讓參數檔名符合實驗的目的，在命名上科榮公司將參數檔名分成兩個部分：前面部分是實驗名稱後面部分是探頭的名稱，兩者之間以一個底線符號予以分開。表二是一些常用實驗的參數檔名範例：

指令	參數檔名	說明
rpar	H_BBI	在 BBI 探頭上執行氫譜的實驗
	C13_QNP	在 QNP 探頭上執行碳譜的實驗
	DEPT-135_BBO	在 BBO 探頭上執行 DEPT-135實驗
	COSY_BBI	在 BBI 探頭上執行 COSY 實驗
	NOESY_SEI	在 SEI 探頭上執行 NOESY 實驗
	TOCSY_BBI	在 BBI 探頭上執行 TOCSY 實驗
	HMQC_BBI	在 BBI 探頭上執行 HMQC 實驗
	HMBC_SEI	在 SEI 探頭上執行 HMBC 實驗
	WaterSuppression_TXI	在 TXI 探頭上執行去水實驗

表二：常用實驗的參數檔名範例。

❁ 執行實驗 (*zg*/*go*/*gs*)

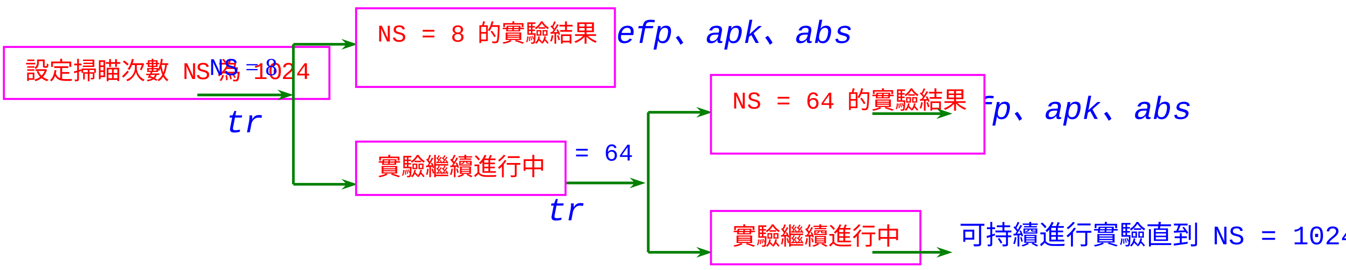
在真正執行實驗之前，習慣上我們會鍵入 `ii` 指令來連繫軟體與硬體的設定。其次，由於不同樣品的濃度不盡相同，所以吸收線圈也應當對應到不同的放大倍率。在此就牽涉到所謂動力範圍 (Dynamic Range，DR) 的觀念。當 “類比–數位” 轉換器 (Analog-to-Digital Converter，ADC) 接收 FID 訊號後，就會把它的電壓當作輸入值並以正比於電壓的二進位數字當作輸出值並存至電腦中。這個過程的工作效率與 ADC 所使用的字串長度是多少位元 (bits) 有關。現代 NMR 使用的字串長度通常為 16 或 18 位元，並且會調整儀器使每次掃瞄時的最大訊號強度剛好填滿動力範圍的最大值，而輸出之值剛好是 ADC 所能處理的最大數目。以 18 位元的數位器為例，其中第一個位元是用來指定正負號之用，而其他剩下的 17 位元就用來決定數值的大小之用。所以輸出的最大值為 $2^{17} - 1 = 131071$，而動力範圍就是 131072：1。有一點要注意的是，NMR 的訊號值必須能符合數位器，也就是說其增益值必須調整好。假使增益值太大，則最大訊號會造成 ADC 溢位 (overflow) 而使基線扭曲；反之，若增益值太小，則一些微弱的訊號會因低於數位器的偵測下限而無法被觀測到。所以 BRUKER 使用 `rga` 指令來自動調整樣品的增益值，使得最強訊號的強度值能滿足最大的動力範圍 (圖十九)。



圖十九：(左) 鍵入 `rga` 指令前，一些微弱訊號的強度小於一個最小的單位，所以該訊號會被視為雜訊；(右) 鍵入 `rga` 指令後，原先最強的訊號的強度會達到動力範圍的最大值，因而有些微弱的訊號強度會被放大到大於一個最小的單位所以被視為訊號而非雜訊。

在實際的動力範圍考量上有兩種比較特殊而常見的狀況。其中一個實際的問題發生在水溶液樣品中同時存在很強及很弱訊號的情形。如果將蛋白質用水溶解，為避免 NH 基被轉換為 ND 基，因此必須以 H_2O 作為溶劑而不能使用 D_2O 作為溶劑。由於 H_2O 的氫訊號十分的強，因此相對之下真正蛋白質的訊號強度就弱得許多。這一類的實驗中我們通常是先將水的訊號予以做前處理 (presaturation 或是 isolation)，之後再對系統做測量。另一種情形是考慮以 $CDCl_3$ 為溶劑的 ^{13}C 實驗。通常溶劑中的 ^{13}C 訊號遠比樣品中的 ^{13}C 訊號為大。因此有時候為了考慮十分微弱的樣品訊號，常刻意的設定較大的收訊增益 RG (receiver gain) 值以增加微弱訊號的強度使之得以被偵測得出來而不考慮溶劑訊號是否會有溢位 (overflow) 情形的產生。

在執行實驗方面，依需要有 *zg*、*go*、與 *gs* 三個指令可供使用。*zg* 指令會先清除相同檔名中原來儲存的資料之後再進行實驗的執行；*go* 指令會保留檔案原來的資料並進行實驗的執行，所以檔案內的資料會被累積；*gs* 指令以互動 (interactive) 的方式隨時顯示出最近一次的實驗結果，可用來逐步修改參數之值並觀察改變參數值前後的實驗結果以便作為參數值調整的依據。在鍵入 *zg*、*go* 指令執行一維譜實驗之後，可以依需要隨時鍵入 *tr* 指令以便立刻將當時已完成掃瞄的資料予以取出並做處理。如此可以隨時掌握實驗執行的進度而不影響實驗的進行 (圖二十)。



圖二十：*tr* 指令的應用圖示。利用 *tr* 指令，我們可以隨時取出已完成部分的實驗結果並將之做 Fourier 轉換。如果已滿意目前的實驗結果，可以鍵入 *halt* 指令來停止實驗的進行。

常用參數說明

以下我們列舉一些常用的指令並對其義意作簡要的說明。在這本使用手冊中，我們一律以斜體的 *courier new* 字體來表示指令。

abs：同時做基線的相位修正 (baseline phase correction) 與圖譜積分

acqu ：將視窗顯示成 FID 的模式

apk：執行自動相位校正的動作

aq：收集 FID 訊號的時間。AQ 自動定為 TD * (2 * SW)$^{-1}$。

as/*ased*：以 "問/答" 的方式一一地將執行實驗時的重要參數予以列出並允許修改之

delp：刪除實驗的頻譜內容 (不改變 FID 的內容)

delsh：刪除勻場檔案 (shim files)

dpa：顯示已執行過實驗的收訊參數檔內容

dual：將目前的頻譜與由 *edc2* 指令所定義的頻譜予以在螢幕上比較

dpp：顯示已執行過實驗的數據處理參數檔內容

ds：執行 dummy scan 的次數

eda ：編輯收訊參數檔

edasp/edsp：以電子式的方式顯示 "硬體線路的聯接方式" (router) 並允許吾人修改

edc：編輯一個新的檔案目錄

edc2：指定一個用來作為比較用的檔案目錄

edcpul /*edpul*: 顯示 "目前/所有" 實驗的脈衝程式

edg：編輯一個繪圖參數檔

edmac：編輯一個巨集指令

edo：設定實驗結果的輸出裝置 (如印表機的設定…)

edp：編輯一個訊號處理參數檔

edprosol：定義各種不同探頭在不同的溶劑下對於各原子核種的脈衝強度與脈衝時間

edte：設定恆溫器的溫度

efp：依序執行加權函數 (weighting function)、快速 Fourier 轉換及相位校正的動作

expt：計算目前實驗所需時間

getprosol：將由 *edprosol* 所定義出的參數值輸入至收訊參數檔內

go：將先前由 *halt*/*stop* 所暫停的一維譜實驗予以繼續執行

halt/*stop*：暫停實驗的執行

iexpno ：創造一個新的檔案目錄，其實驗序號 (Experimental number) 值自動加一

ii：連繫軟體與硬體的設定

kill：刪除不欲繼續執行的程式

lb：設定 “譜線寬化” (line broadening) 值

li：顯示積分值內容

lock：設定樣品內氘溶劑的種類

maxi/mi：設定 peak picking 時的最大/小高度值

multizg：依序執行多個相同檔名且實驗序號相連的檔案

nmrsim：啟動 NMR-SIM 電腦模擬應用軟體

ns：設定實驗掃瞄的次數

o1：設定頻譜中央位置的 “相對載頻” (relative carrier frequency) 值

p1 ~ p31：脈衝時間

paropt：對某一實驗參數作漸進式的調整

pl1 ~ pl31：脈衝強度

plot：印出實驗結果

ppg：將脈衝程式顯示在螢幕上

pps：將 peak picking 的結果顯示在螢幕上或是印出 (視 *edo* 之設定而定)

re/rep：進入 Experimental Number/Process Number (Exp.No./Proc.No.)

rga：命令系統自行做 “接收器增益值” (receiver gain，RG 值) 的設定工作

rpar：讀取一個先前儲存的實驗參數設定檔

rsh：讀取一個先前儲存的 “勻場檔案” (shim file)

setres：改變使用者界面 (user interface) 的外觀

setti：為實驗輸入其 “標題” (title)

si：用來紀錄頻譜的點數。我們可以設 *si* 值等於 *td* 值來達到最大的頻譜解析度

sino：測量 “訊雜比” 值 (signal-to-noise ratio)

sr：設定內部的頻率參考值

sw/swh：頻譜所涵蓋的範圍 (分別以 ppm 與 Hz 為單位)

sym：將具有對稱性的同核二維頻譜修飾成對稱的型態

td：用來紀錄 FID 的點數

`tr`：把目前剛執行完的 FID 內容予以複製並取出。我們可以因此觀察 *ns* 值是否足夠

`view`：預先觀察實驗頻譜的印出結果

`wobb`：調整共振頻率以及探頭的阻抗

`wsh`：將目前的 "勻場值" (shim values) 存成一個檔案

`xf2/xf1`：對二維譜的 F2/F1 方向執行快速 Fourier 轉換

`xfb`：對二維譜執行快速 Fourier 轉換並除去 "quad spike"

`xwinnmr`：啟動 XWINNMR 應用軟體

`xwinplot`：啟動 XWINPLOT 應用軟體

`zg/go`：清除/不清除 之前暫存在緩衝記憶體的內容並執行目前收訊參數的實驗

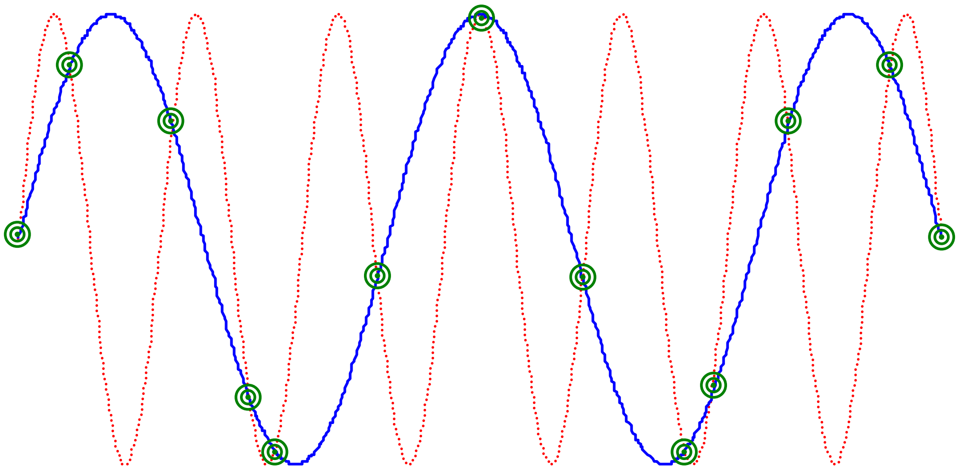
除了取用適當的放大倍率 `rg` 值使 FID 的強度剛好達到動力範圍之外，FID 所使用的收訊時間長度 AQ 也是訊號取樣的重要因素。基於 FID 乃是在不完美磁場均勻度下的實驗結果，所以在決定 AQ 長度時一般是設定 AQ ≅ 4/3 FID。

對於 FID 資料的儲存與處理上，因為自由感應衰退訊號是一種範圍在無線電電磁波頻率的高頻率連續訊號，我們必須將它數位化後才能儲存至電腦。利用數位器 (digitizer) 可將電壓的輸入轉換成代表電壓大小的二位元輸出。由於 FID 的振盪頻率是在電磁波範圍，而數位器的測量速率只有在音頻的範圍，所以在做轉換以前必需將觀測頻率減掉某一個定值以減少數學上的運算量。舉例來說，對 400 MHz 的儀器而言，氫核共振的範圍大致上為 0 ~ 10 ppm (也就是 0 ~ 4000 Hz)，但事實上的共振頻率為 400,000,000 到 4000,004,000 Hz。由於重要的資訊只是這二個數字的差值，所以不需儲存太大的數值在電腦中。偵測系統會依吾人的設定自動減掉 400,000,000 Hz 以減少資料的儲存空間。

至於取樣的速率則由我們所設定的頻譜寬度來決定。以一個 300 MHz 的波譜儀來說，通常氫譜是取 –1 ~ 14 ppm 的寬度 (也就是說約 4500 Hz 的頻寬)。在理論上如要用數位化形式來代表某頻率時，則一個週期內至少要有二個取樣點才不會使頻率失真。因此對 4500 Hz 的頻率寬度而言，至少需要 9000 個取樣點，因而取樣時間間隔應不大於 1/9000 秒。同理可知，假設頻譜寬度為 X Hz，則至少需要 2X 個取樣點，所以取樣時間間隔應不大於 1/(2X) 秒。電腦程式會自動設定取樣的時間 $AQ = TD * (2*SW)^{-1}$ 以滿足

Nyquist theorem (見下方解釋) 及減少記憶體容量的消耗，如此才能加速資料的運算。

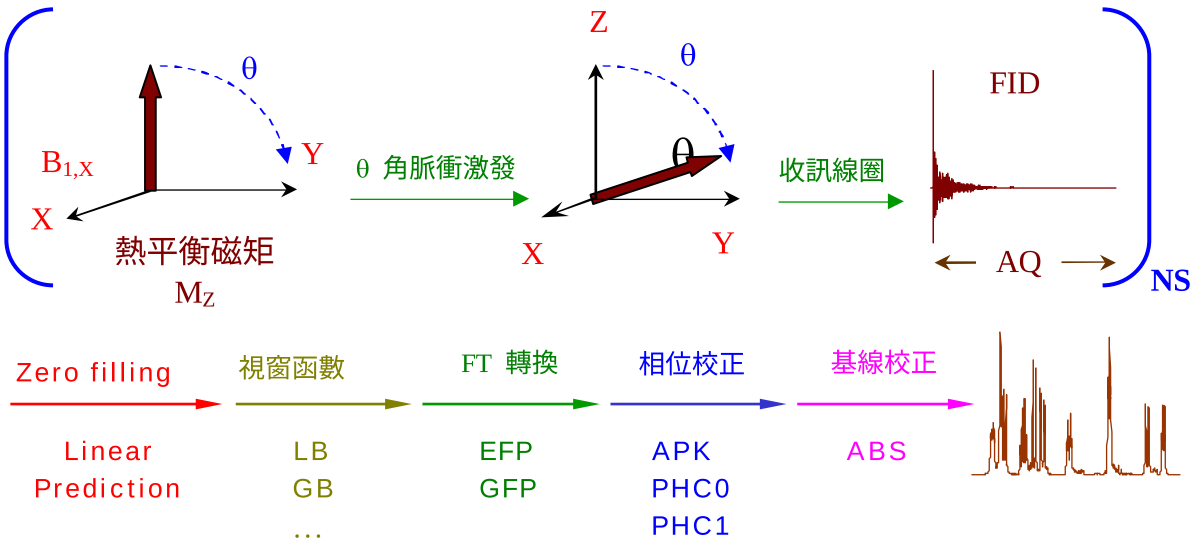
上述中取樣速度所得到的最高頻率稱之為 Nyquist 頻率。如果訊號頻率高於 Nyquist 頻率時，則可能會有二個頻率通過相同的資料取樣點，而造成頻譜 “回疊” (folding) 的現象 (圖二十一)。例如說，假使頻譜寬度設定太小的話，在頻譜寬度以外的吸收峰會因取樣速率不足而造成回疊現象，此舉會造成在頻譜位置上出現不該有的吸收峰。由於在頻寬以內的吸收峰會出現在它們正常的位置上，而這些多出來的回疊峰其相位和正常吸收峰有所不同，所以要檢查該訊號是否為回疊吸收峰很容易，只要將頻譜視窗 (window) 往某一方向移動 (例如將 O1 值向左移 200 Hz) 則所有正常吸收峰的相位會順著視窗的移動方向而移動但回疊吸收峰則會往相反方向移動而造成其頻率與相位值不等比例的改變。BRUKER 利用前述 digital filtering 與 oversampling 的技術，不僅解決頻譜回疊的問題並同時提高了取樣時訊號的動力範圍值以及訊號的靈敏度。



圖二十一： Nyquist theorem 告訴我們訊號的取樣速率不得少於最高頻率的 2 倍，否則可能發生如圖所示的情形 (也就是說兩個不同的頻率會被誤認為相同的頻率)。上圖表示當某一個訊號 (dashed line) 的頻率高於 Nyquist 頻率時，則其可能會與另一個頻率 (solid line) 通過相同的資料取樣點 “◎” 而造成頻譜上兩者位於相同的化學位移位置上而造成混淆，因而有頻譜 “回疊” 的現象發生。

步驟四：訊號處理與繪圖 (Data processing and plotting)

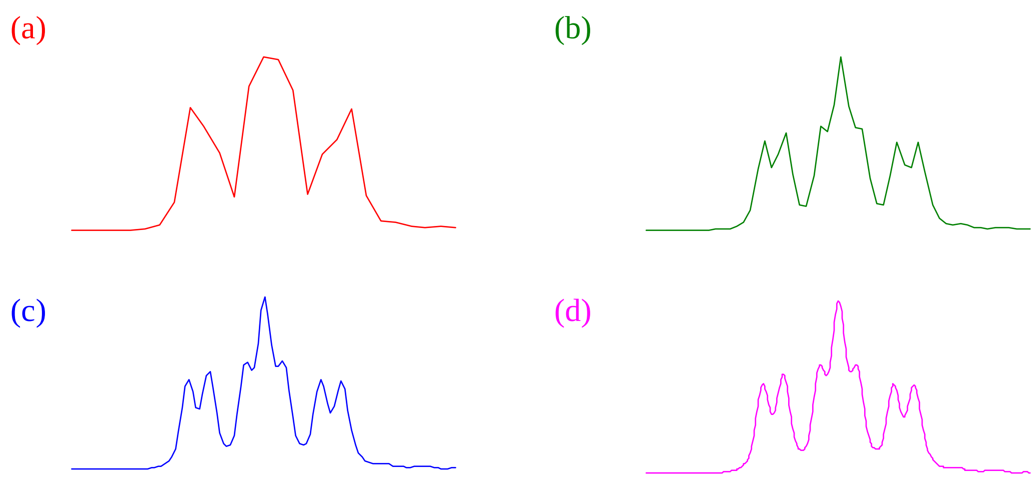
脈衝式 NMR 所得到的原始資料是所謂時域訊號 (time domain) 的 FID，它必需經過 Fourier 轉換後才能成為我們熟悉且易於分析的頻域訊號 (frequency domain)。而為了強調頻譜訊號的某些特性，常常在執行轉換之前對 FID 做一些前處理。BRUKER *AVANCE* NMR 將這種轉換的步驟分解成如圖二十二所示的處理流程。



圖二十二：核磁共振波譜儀訊號處理流程。

零填滿 (Zero filling)

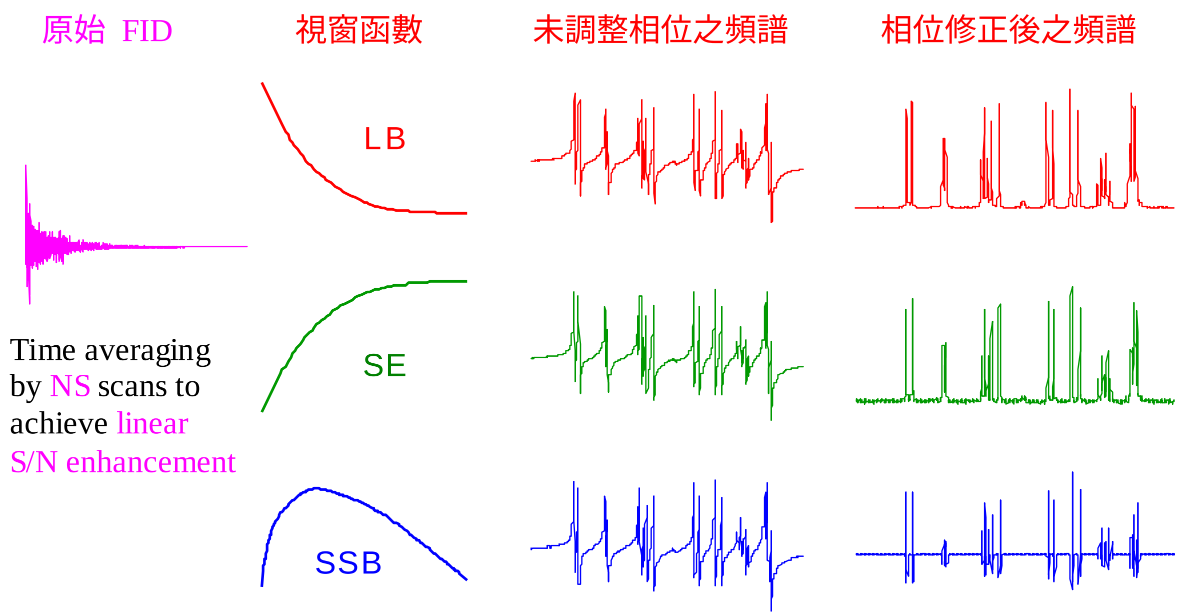
BRUKER 將頻譜分成兩個部分，其中一半由 X 方向相位所處理的稱為實數部分；另一半由 Y 方向相位所處理的稱為虛數部分，虛數部分的資訊一般只提供相位校正之用。如果有需要，我們可以於一維氫譜實驗中設定 si = td，在 FID 的末端加入一些強度為零的資料點 (也就是零填滿的方式)，之後在 Fourier 轉換時就可以達到最大的頻譜解析度以及提昇訊號的靈敏度。圖二十三顯示出零填滿對頻譜解析度的影響。



圖二十三： 零填滿對頻譜解析度的影響。(a) 圖是取用 si = 0.5 · td 下的結果。由於資料點不夠，所以損失了頻譜解析度；(b) 圖是取用 si = td 下的結果。由於資料點足夠，所以頻譜解析度未 損失；(c) (d) 圖分別是取用 si = 2 · td 及 si = 8 · td下的結果。雖然資料點過多，但是頻 譜解析度並未因此增加。

❁ 視窗函數 (Window/Weighting function)

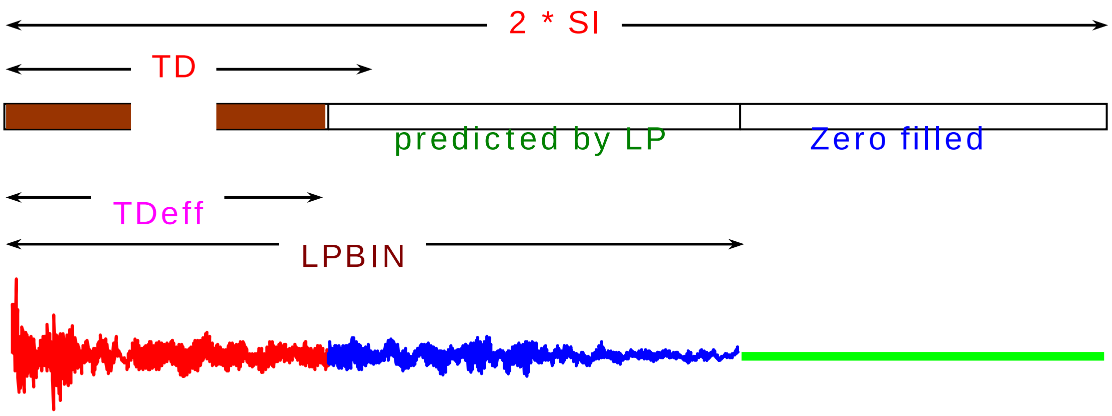
基於使用較多的掃瞄次數 (time averaging) 藉以線性的方式來提升訊號的訊雜比值 (S/N ratio) 通常無法滿足稀薄濃度的樣品或是相對靈敏度較小的核種，因此在將 FID 執行 Fourier 轉換之前，對於提升頻譜靈敏度的處理上通常是將實驗所得的 FID 予以 “乘上” 一個隨時間增加而遞減的視窗函數 (window function) 或稱為加權函數 (weighting function) 藉此以非線性的方式來提升樣品的訊雜比值。而如果要增加樣品的頻譜解析度，則是將實驗所得的 FID “乘上” 一個隨時間增加而遞增的視窗函數藉以非線性的方式來改善頻譜解析度 (spectral resolution)。事實上，這樣的 “乘法” 是屬於一種線性褶積 (convolution) 方式的技巧應用 (圖二十四)。這一類的線性褶積方式是直接作用於時域空間上的自由感應衰退 FID 上。常見的視窗函數有 LB (Line Broadening) 與 GB (Line Broadening 加上 Gaussian multiplication) 及 SSB (Shifted Sine Bell) 三種。



圖二十四：不同視窗函數下所獲得不同靈敏度與訊號解析度的結果。

❁ 線性預測 (Linear Prediction，LP)

液態 NMR 的線性預測通常用於多維頻譜上，其做法是基於原有的實驗數據點來推測該 FID 在未受 truncated 時應有的原始 FID。在液態 NMR 中，通常只使用向前式 (forward) 的線性預測方式；而在固態 NMR 中，通常只使用向後式 (backward) 的線性預測方式。向前式的線性預測方式示意圖見圖二十五。



圖二十五： 向前式線性預測的示意圖。左方是一個被截斷 (truncated) 的 FID 數據點 (共 TD 個)。中央的 (LPBIN – TDeff) 部分是使用線性預測技術所推測出 “可能” 的 FID 部分。右方 (2 * SI – LPBIN) 是前述的零填滿資料點。

Fourier 轉換 (Fourier transform)

正確的說法應該稱之為 Cooley-Tukey radix-2 fast Fourier transform (快速 Fourier 轉換)。早期執行一次傳統的 Fourier 轉換需花費約 20 分鐘。自 1965 年 Cooley 與 Tukey 兩人提出 Cooley-Tukey algorithm 之後，配合微電腦處理器的快速發展，而有了快速 Fourier 轉換的技術。由於我們通常是以 2 作為基底，所以作為頻譜資料點的 si 值必須符合 si = 2^N [即使像在一般的二維譜或是 T_1/T_2 弛豫值測量時其遞增值 (incremented value) 不需符合該數學式]。如同前面所述，快速 Fourier 轉換的目的就是要將 FID 轉換成為我們熟悉且易於分析的頻譜。

相位校正 (Phase correction)

造成頻譜相位扭曲的主因有以下幾種：

1. 死亡時間 (Dead Time，DE)；
2. 旋轉座標頻率 (載頻) 與各訊號 Larmor 頻率之間的頻率偏差值 (frequency offset)；
3. 頻率控制單元 (FCU) 與時間控制單元 (TCU) 之間的不同步；
4. 由於數位化過濾器 (digital filter) 所造成的收訊時間差值；
5. 各 Hamiltonians 之間的不均勻作用 (inhomogeneous Hamiltonian interactions)。

除了上述第 5 點之外，對於大部分自旋量子數 I = 1/2 的自旋原子核而言，這些相位的扭曲皆可以藉由零次方與一次方的相位校正來獲得完全同相位的頻譜。BRUKER 也

提供了 *apk* 指令來自動對頻譜的相位做校正, 但在實驗的頻譜寬度設定上需使之距離最左/右兩側訊號約 1 ppm。零次方與一次方的相位校正做法如下所述 (圖二十六)：

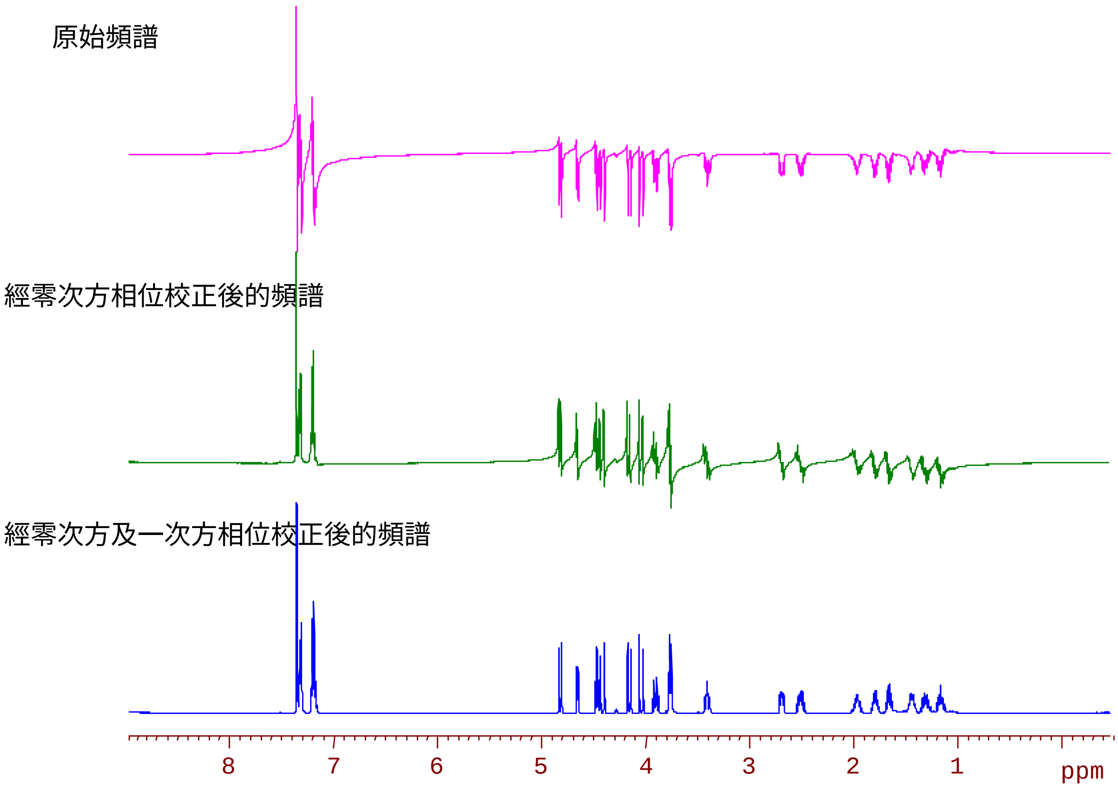
(1) 我們首先以滑鼠左鍵來單響左方面板的 phase 圖案。

(2) 接著再以滑鼠左鍵來單響左方面板的 cursor 圖案。

(3) 移動滑鼠至主螢幕上 (此時游標的外形將變成 ⇩) 並以滑鼠中鍵來定義最左方吸收峰的位置。之後的一次項相位校正會以此頻率作為 “基準點”。

(4) 接著分別以滑鼠左鍵單響 PH0 與 PH1 上並且以拖曳 (drag) 的方式來分別對零次方與一次方做相位校正。

(5) 完成後以滑鼠左鍵來單響左方面板的 return 圖案並選擇 Save & return。



圖二十六：零次項與一次項的相位校正應用實例。

化學位移值的校正 (Calibration of chemical shift value)

一般來說, 溫度, 酸鹼度, 離子性強度 (ionic strength) 以及金屬離子的結合 (metal-ion binding) 都是影響化學位移的因素。此外，化學位移的數值是一個相對的數字，視旋轉參考座標 (reference rotating frame) 之值及頻譜的設定值 sr 而定。對於不同的核種而言

，皆有其不同的標準樣品分子作為內部化學位移值的參考依據。表三是一般常用核種的標準樣品及其基本資料：

核種	自旋量子數	化學位移範圍	標準樣品
^{1}H	1/2	15 ~ –2	$Si(CH_3)_4$
^{6}Li	1	5 ~ –10	LiCl in H_2O
^{7}Li	3/2	5 ~ –10	LiCl in H_2O
^{13}C	1/2	250 ~ –20	$Si(CH_3)_4$
^{15}N	1/2	1200 ~ –500	CH_3NO_2
^{17}O	5/2	1800 ~ –100	H_2O
^{19}F	1/2	100 ~ –300	$CFCl_3$
^{23}Na	3/2	10 ~ –80	NaCl in H_2O
^{27}Al	5/2	300 ~–300	$[Al(H_2O)_6]^{3+}$
^{29}Si	1/2	100 ~ –400	$Si(CH_3)_4$
^{31}P	1/2	500 ~ –500	H_3PO_4

表三：常用原子核的化學位移範圍值及其標準樣品

化學位移值的校正步驟可如下所述：

(1) 首先以滑鼠左鍵來單響左方面板的 calibrate 圖案。

(2) 移動滑鼠至主螢幕上的某吸收峰位置 (此時游標的外形將變成 ⇩) 並單響滑鼠中鍵來定義該吸收峰的位置。

(3) 為此吸收峰定義其化學位移值即可 (此時 sr 值會自動被修正)。

附註： 對於兩個要互相比較其化學位移值的頻譜而言 (像是二維頻譜上的一維頻譜投影)，必須確定兩者有相同的 (1) Spectral width (SW 值)；(2) O1 值；(3) SR 值。

❁ 積分值的設定與校正 (Integration)

一般所使用的方波脈衝強度都強到足以 “均勻地” 激發頻率區間內所有的吸收峰，因此使用者可以將訊號的面積予以積分，用以對不同的吸收訊號做定量上的比較。積分

值的設定如下所述：

(1) 以滑鼠左鍵來單響左方面板的 integrate 圖案。

(2) 移動滑鼠至主螢幕上並單響滑鼠左鍵 (此時游標的外形將變成 ⇩)。

(3) 第一次單響滑鼠中鍵以定義第一個積分區間的左邊界；
第二次單響滑鼠中鍵以定義第一個積分區間的右邊界。

(4) 第三次單響滑鼠中鍵以定義第二個積分區間的左邊界；
第四次單響滑鼠中鍵以定義第二個積分區間的右邊界。

(5) 重覆步驟 (4) 將所有需要積分的區間予以定義。

(6) 調整積分曲線的 slope 與 bias 值：

(i) 移動滑鼠至主螢幕上並單響滑鼠左鍵 (此時游標的外形將變成 ⇩)；

(ii) 移動游標至要調整的整積分曲線上並再單響滑鼠左鍵 (此時該積分曲線的上方將有一個星號 “*” 或是 “⇩”，表示這是 “目前的” 積分曲線)；

(iii) 按住滑鼠左鍵不放且以拖拉的方式來改變 slope 與 bias 之值：

(7) 定義完成後單響滑鼠左鍵以於任意位置 → 再以滑鼠左鍵單響左下方的 return 圖案並選 Save as ‘intrng’ & return ⇒ 將積分的資料予以存檔。

附註：

1. 吾人可以先定義某一積分曲線為 “current”，再以滑鼠左鍵單響左方的 calibrate 圖案並輸入一數值作為基準值。其它的積分曲線積分值將會等比例的 放大/縮小。

2. 積分值設定與校正中的 slope 與 bias 就好比是相位校正中的一次方與零次方校正。為達定量上比較兩積分值，必須調整此二值。

3. 不同分子之間的積分值定量比較可依下法為之：

(i) 先取出 “基準” spectrum，並於其內定義所需的積分區間；

(ii) 以滑鼠左鍵去指定某一區間為 “current”；

(iii) 單響滑鼠左鍵於左方的 calibrate 圖案並輸入基準值；

(iv) 依序單響 return 圖案並選 Save as ‘intrng’ & return；

(v) 以 File menu → Search … 取出要與基準 spectrum 做比較的頻譜；

(vi) 以滑鼠左鍵來單響左方面板的 integrate 圖案；

(vii) File menu → Read ‘intrng’ → 單響 lastcal 則原先的積分值會等比例的改變。

一維頻譜實驗敘述

BRUKER *AVANCE* NMR 波譜儀的軟硬體發展至今，絕大多數的實驗都能用圖十三的觀念予以"模組化"，使得往日複雜的操作成為今日簡單的一般化手續而已。下面是執行 BRUKER *AVANCE* 實驗的全程敘述，讀者可配合圖十三加深對實驗操作上的理解。

首先得確定恆溫器是否使用中。若是此時恆溫器的溫度與室溫差異很大時，則必須先使系統回溫至室溫附近才可以繼續以下的動作。其次，使用者取出留在探頭內的樣品管再置入自己的樣品管於適當的探頭中。之後以 *edc* 指令為目前要執行的實驗建立一個檔案目錄 (BRUKER 實驗是先建立目錄再執行實驗)。利用 *rpar* 指令將配合該實驗目的所需要的所有參數檔都寫入目前的目錄中 (*rpar* 包含了取得實驗結果 FID 所使用的收訊參數檔、處理 FID 時所用的訊號處理參數檔、繪圖時所使用的繪圖參數檔、指定繪圖裝置的輸出裝置檔、以及用於該實驗的標題檔)。都完成之後就用 *lock* 指令去指定溶劑中的氘訊號種類。

再其次是做"WOBBLE"的動作以確定脈衝激發時所輸出的頻率與能量可發揮最大的功效。執行"WOBBLE"時最好停止樣品管旋轉。接下來是影響實驗成敗甚鉅的勻場動作 (見前面第 15 頁的敘述)。接著是鍵入 *ii* 指令來檢查軟硬體的匹配與否。由於我們並不知道樣品是屬於"稀薄"或是"濃"，最好的方法就是以 *rga* 指令去讓系統自行決定吸收線圈要放大的倍率。請注意，由 *rga* 所決定的數值不一定是最好的，但通常是最安全的。此外，執行 *rga* 指令所得的 rg 值也可以作為樣品濃度大小的判斷依據，藉此我們可以設定所須的掃瞄次數 NS 與 DS。

既然軟硬體及磁場均勻度都滿意，就可以鍵入 *zg* 指令來執行實驗了。配合"double-buffer"的設計，BRUKER 提供了像 *halt*、*tr* 等指令方便吾人於途中可隨時取出目前的結果來檢驗實驗的進度。記住一點，NMR 實驗所得到的原始資訊是時域 (time domain) 的 FID 訊號，而儀器的穩定性與實驗的執行結果端視 FID 的好壞與否。

在對 FID 做 Fourier 轉換之前，依需要可以將原始 FID 訊號摺積 (convolute) 上適當的視窗函數 (window 或 weighting function) 以提升訊號的靈敏度或是頻譜的解析度

。依照不同原子核的頻譜特性以及摺積定理，對於氫譜訊號摺積上 0.1 ~ 0.3 Hz 的 `lb` 值以及對碳譜訊號摺積上 1 ~ 3 Hz 的 `lb` 值可能達到訊號的 matched filter condition，而使訊號的靈敏度提升最多。完成 Fourier 轉換之後是將頻譜做相位修正以及基線修正以完成實驗之執行。

此外，BRUKER *AVANCE* NMR 提供了巨集指令的功能，使用者可以依需要以 *edmac* 指令將一系列的實驗指令彙編成單一的一個巨集指令以簡化操作。譬如說要以一個巨集指令來描述上述的一維氫譜實驗動作的話，該巨集指令的內容應該類似下面的型式：

```
rpar H_BBO all
lock cdcl3
ii
rga
ns 4
ds 0
zg
efp
apk
abs
```

當然，我們可以依需要在上述的巨集指令中於適當的位置加上某些功能的指令來加入其他的功能。

§3 BRUKER *AVANCE* NMR 繪圖軟體 — XWINPLOT

本節介紹如何以 XWINPLOT 繪圖軟體來畫出所想要的列印結果。XWINPLOT 是一套建構在 XWINNMR 之下且使用圖形介面來畫出 XWINNMR 實驗結果或是 NMRSIM 模擬實驗結果的應用軟體。藉由 WYSIWYG (What You See Is What You Get) 的互動概念，使我們能輕易地於列印前觀察其內容並繪出所需之結果。本篇內容的寫作方式是以 “模組化” (module) 的寫法, 把每一種獨立而功能不同的繪圖做法歸類於獨立的段落中。使用者可依需要自行來選用所需之部分。XWINPLOT 可適用在 SGI O2/INDY 或是 Windows NT 上。本節是以 SGI O2/INDY 為主，內容是基於在 SGI UNIX 作業之下為準，其在 Windows NT 之使用方法不但與在 SGI O2/INDY 十分相似，而且包含了 Windows 的 “Copy-and-Paste” 功能，使得使用者可以輕易的將 XWINPLOT 的內容予以轉換至 Word、ChemDraw 或 PowerPoint 等等支援 Windows NT 的應用軟體上。

啟動 XWINPLOT

1. 先啟動 XWINNMR。
2. 直接鍵入 `xwinplot` 指令或是選 Windows menu → Plot Editor。

畫出一維頻譜及參數檔內容

3. 單響左上方的 [data] icon ⇒ 出現 Data Set Selector 對話框。
4. 單響 Data Set Selector 對話框左下方的 [Edit] icon ⇒ 出現 Portfolio Editor 對話框。
5. 於 Portfolio Editor 對話框內選取所有以目前有可能需要的檔案 (例如此時我們選用 /u/data/guest/exam1d/1/pdata/1 的檔案內容)。
6. 依序單響 [Append] → [Apply] → [Close] 以關閉 Portfolio Editor 對話框並同時將所選定的檔案予以載入 Data Set Selector 對話框下方的 file list 內以便之後使用。
7. 於 Data Set Selector 對話框內選取該檔案 → 單響 [OK] 以離開 Data Set Selector。
8. 單響左方的 [Create 1D spectrum] icon → 使用滑鼠左鍵並以 “drag-and-drop” 的方式畫出此一維頻譜 → 於此一維頻譜上按住滑鼠右鍵並選 [Edit…] → 在 Dimension 欄鍵入 20 × 11；在 Position 欄鍵入 0.5 × 4 → 單響 [OK] 以離開。
9. 重覆步驟 8，但是此時是單響左方的 [Create parameter object] icon → 在 Position 欄

鍵入 22 × 3 →單響 [Basic] → 改 font size 為 9 point → 單響 [Apply] 以便立刻看出改變 font size 後的節果。吾人可以嘗試不同的 font size 直到滿意為止 → 單響 [OK] 以離開。(注意：原廠所提供的 "exam1d" 檔案並沒有附參數檔，請找其他具有的參數檔的檔案來使用。)

標題的設定

10. 先單響 [Create title] icon → 移動滑鼠左鍵至螢幕上所欲之位置並單響之以便將在 XWINNMR 中輸入的標題內容予以載入 XWINPLOT 的視窗中。此時依步驟 8、9 來定 Position 為 8 × 18 而 font size 為 14 point (註：我們必需先於 XWINNMR 中以 *setti* 指令設定好 Title 的內容)。

加上 **Peak Picking**

11. 移動滑鼠至該一維頻譜上並按住滑右鍵選 [Edit…] → 選 ☒ Show Peaks 及 ☒ Show Peak Marks → 單響 [OK] 以離開 (註：我們必需先於 XWINNMR 中已設好 peak picking 的內容並於 *edg* 中設定 ILABELS = [yes])。

加上積分值

12. 移動滑鼠至該一維頻譜上並按住滑右鍵選 [Edit…] → 選 ☒ Show Integrals、☒ Show Integral Labels 以及 ☑ Scale Bounding Box ⇒ 此時 Dimension 上顯示為 20 × 17.55 → 單響 [OK] 以離開 (註：我們必需先於 XWINNMR 中已設定好 integration 的內容並於 *edg* 中設定 INTEGR = [yes])。

P.S. 如果 peak picking 與 integration 沒有作用，可以從 XWINNMR menu → NMR Interface → 單響 [Create Peak List] 及 [Create Integrals] 以造出所需要的列表。

列印一維頻譜

13. File menu → Print… → 單響 [Setup] 以設定 paper size 為 A4 及適當的 paper type → 完成後單響 [OK] → 單響 [Print] 以列印之。如果您要使目前的參數設定作為以後列印的預設值，可以於 Printer Setup 視窗下選 File menu → Save As Default。

強調某一部分的頻譜 (假設我們要將之放大 3 倍並置於正上方 4 公分處)

14. Options menu → Global Setup… → 於 Blowup Offset 欄中鍵入 4；於 Blowup Expansion Factor 欄中鍵入 3 → 單響 [OK]。
15. 先單響左上方的 [EXPAND] icon → 在按住 [Alt] 鍵的同時移動滑鼠至欲放大的頻譜部分並用滑鼠左鍵以 "drag-and-drop" 的方式圈選 2.3 ~ 2.8 ppm部分的頻譜 ⇒ 則 該部分的頻譜會被放大 3 倍並置於原位置的正上方 4 公分處。
16. 吾人可以使用滑鼠中鍵來 "同時" 移動放大的頻譜部分及其下方的放大數字部分；或是我們也可以先按住 [Ctrl] 或 [Alt] 鍵不放再使用滑鼠中鍵來只移動下方的放大數字部分使外觀更清晰。

畫出 FID

17. 單響左方的 [Create FID] icon → 使用滑鼠左鍵並以 "drag-and-drop" 的方式畫出此 FID → 按住滑右鍵選 [Edit…] → 在 Dimension 欄鍵入 4 × 2;在 Position 欄鍵入22 × 0.5 並且除去 □ Axis on Bottom 選項 → 單響 [Apply] → 單響 [OK] 以離開。
18. 如果以滑鼠左鍵來拖曳包圍在 FID 外圍的 "handles" 時，則可等量地 放大/縮小該 FID；如果先按住 [Ctrl]、[Shift]或[Alt] 鍵不放再使用滑鼠左鍵來拖曳 "handles" 時，則只移動 "handles" 而已 (作為 "chop" 的功能)。

畫出一個箭號以指出某一頻率的吸收峰

19. 選擇左方面板的 ◆[Basic] icon。
20. 單響左方面板的 [Create line] icon。
21. 移動滑鼠左鍵並以左上至右下的方向來畫出一條指向 7.28 ppm 吸收峰的直線
22. 按滑鼠右鍵並選 [Edit…] → 於 Arrow Type 中選 [→]；於 Arrow Tip Width 中設為 2.0 → 單響 [Apply] 以觀察其結果並重覆此動作到滿意為止 → 單響 [OK] 以離開。如果您要以較精確的方式去移動物件，可以先定 Options menu → Layout Setup… → ◆0.1 cm → [OK]。

🖰 加上說明文字 (Annotation)

23. 選擇左方面板的 ◆Basic icon。
24. 單響左方面板的 Create text object icon。
25. 移動游標至螢幕上並單響滑鼠左鍵。
26. 鍵入所需之說明文字內容 (譬如說：“The solvent peak”)。
27. 單響滑鼠左鍵至說明文字所希望放置的位置。
28. 可以按滑鼠右鍵並選 Edit… → 以修改說明文字的屬性 (此時我們改 Font Size 為 10 point)。例如說我們可以單響 Edit Text icon → 單響 Character Chart 以顯示一些無法直接由鍵盤上輸入之符號字。完成後再依步驟 13 列印一維頻譜。

附註：如果您是使用 Windows NT 版的 XWINPLOT 而要在頻譜中加入說明文字時，作者建議您使用 “Copy-and-Paste” 的方式先將 XWINPLOT 中的內容予以傳送至 Word 或是 PowerPoint，之後再於 Word/PowerPoint 內以繪圖的方式加上說明文字。

🖰 將一張頻譜分成 6 張 (3 x 2) A4 紙印出

29. Options menu → Printer Setup… → 在 Paper Size： 欄選擇 A4；在 Printer Type： 欄選擇 HP Laser 4L (依使用者的印表機機型來設定)；在 Split to X × Y Pages： 欄輸入 3 × 2 → 單響 Apply → 單響 OK。
30. Edit menu → Mark All 以全選所有物件 → 單響上方的 Group button → 回到主螢幕後以滑鼠左鍵將 spectrum 放大至所需的大小或是按滑鼠右鍵並選 Edit… 來定其 Position 及 Dimension 之後再列印即可。

🖰 將 C13、DEPT-90、及 DEPT-135 頻譜畫在同一張 A4 紙上

31. File menu → New ⇒ 打開一個空白的 Layout。
32. 單響左上方的 data icon ⇒ 出現 Data Set Selector 對話框 → 單響 Data Set Selector對話框右下方的 Edit icon ⇒ 出現 Portfolio Editor 對話框 → 於 Portfolio

Editor 對話框內選取所需要的 C13、DEPT-90 及 DEPT-135 頻譜檔案 → 單響 Apply、Append、OK 以選取檔案並離開 Portfolio Editor → 單響 OK 以離開 Data Set Selector 對話框。

33. 單響左方的 Create 1D spectrum icon → 使用滑鼠左鍵並以 “drag-and-drop” 的方式畫出此一維頻譜。重覆此步驟兩次使得 Layout 上包含 C13、DEPT-90 及 DEPT-135 三個spectra。
34. 單響最上方的 spectrum 並按滑鼠右鍵且選 Edit… → 於 Edit Display Object 的最下方單響 Data Set : Select from Portfolio 欄並選取 C13 的檔案。
35. 單響中央的 spectrum 並按滑鼠右鍵且選 Edit… → 於 Edit Display Object 的最下方單響 Data Set : Select from Portfolio 欄並選取 DEPT-90 的檔案。
36. 單響最下方的 spectrum 並按滑鼠右鍵且選 Edit… → 於 Edit Display Object 的最下方單響 Data Set : Select from Portfolio 欄並選取 DEPT-135 的檔案 ⇒ 如此我們就可讓這三個 spectra 置於同一 A4 視窗上了。
37. File menu → Save as… → 於其下方輸入檔名。如此以後我們就可以用 File → Open 的方式把此一列印格式取出以供下一次的使用。

🖰 儲存設定好的 XWINPLOT 繪圖參數檔

38. File menu → Save as… → 於 XWINPLOT Filename 視窗下方的 Selection 欄中輸入完整的 pathname/filename。如此以後我們就可以用 File → Open 的方式把此一“列印格式” 取出以供下一次的使用 (類似 *edg* 的設定)。
39. 於 XWINNMR 中鍵入 *edo* 指令，於 LAYOUT 欄中輸入步驟 37 所設定的完整 pathname/filename 後，則下一次啟動 XWINPLOT 應用程式時就自動以該檔案的設定出現。

🖰 畫出二維頻譜

40. File menu → New ⇒ 打開一個空白的視窗。
41. 單響左上方的 data icon ⇒ 出現 Data Set Selector 對話框 → 單響 Data Set Selector對話框右下方的 Edit icon ⇒ 出現 Portfolio Editor 對話框 → 於 Portfolio

Editor 對話框內選取所需要的二維頻譜檔案 → 單響 Apply、Append、OK 以選取檔案並離開 Portfolio Editor → 單響 OK 以離開 Data Set Selector 對話框。

42. 單響左上的 Create 2D spectrum icon → 使用滑鼠左鍵並以 “drag-and-drop” 的方式畫出此二維頻譜 → 按滑鼠右鍵並選 Edit… 來調整此二維頻譜的 Position 及 Dimension 值。
43. 單響左上方的 data icon ⇒ 出現 Data Set Selector 對話框 → 單響 Data Set Selector對話框右下方的 Edit icon ⇒ 出現 Portfolio Editor 對話框 → 於 Portfolio Editor 對話框內選取所需要的一維 F2 頻譜檔案 → 單響 Apply、Append、OK 以選取檔案並離開 Portfolio Editor → 單響 OK 以離開 Data Set Selector 對話框。
44. 單響左方的 Create 1D spectrum icon → 使用滑鼠左鍵並以 “drag-and-drop” 的方式畫出此一維頻譜 → 按滑鼠右鍵且選 Edit… → 取消 ☑ Axis on Bottom並將之移動到二維頻譜的上方。
45. 重覆步驟 46、47 但此時是選取所需要的一維 F1 頻譜檔案。不同的是此時要旋轉此一維頻譜，其做法是按滑鼠右鍵且選 Rotate 3 次。

附註： 如果您想要比較兩張二維頻譜圖時 (譬如說要比較 COSY 與 TOCSY 或是 HMQC 與 HMBC), 您可以將兩張二維頻譜圖予以完全重疊但是將其中一張二維頻譜圖的訊號部分以 “虛線” 的方式來畫出。這樣一來就可以使用黑白的雷射印表機來區分出兩者的不同。

畫出堆積圖 (Stacked plot) (假設我們要畫出的實驗分別是 1、2、3 的三個檔案)

46. 單響左上方的 data icon ⇒ 出現 Data Set Selector 對話框 → 單響 Data Set Selector 對話框右下方的 Edit icon ⇒ 出現 Portfolio Editor 對話框 → 於 Portfolio Editor 對話框內選取所需要的三個檔案 → 單響 Apply、Append、OK 以選取檔案並離開 Portfolio Editor → 選擇 Exp.No. = 1 的檔案後單響 OK 以離開 Data Set Selector 對話框。
47. 單響左方的 Create stacked 1D spectra icon → 使用滑鼠左鍵並以 “drag-and-drop” 的方式畫出 Exp.No. = 1 的一維頻譜 → 按滑鼠右鍵且選 Edit… → 於 Number of

Stacked Spectra 欄中輸入 3 → 於 Spectra Offset 欄中輸入 1 × 1 並單響 Apply 以觀察結果 → 改變 Spectra Offset 欄中之值直到滿意為止。

畫出T_1/T_2/Diffusion 曲線擬合 (curve fitting) 圖

48. 單響左上方的 data icon ⇒ 出現 Data Set Selector 對話框 → 單響 Data Set Selector 對話框右下方的 Edit icon ⇒ 出現 Portfolio Editor 對話框 → 於 Portfolio Editor 對話框內選取經過 `simfit` 指令所得到的 curve fitting 結果檔案 → 單響 Apply、Append、OK 以選取檔案並離開 Portfolio Editor → 於 Data Set Selector 對話框選擇該檔案後單響 OK 以離開 Data Set Selector 對話框。
49. 單響左方的 T_1T_2 icon → 使用滑鼠左鍵並以 “drag-and-drop” 的方式畫出此 curve fitting 的結果 → 按滑鼠右鍵且選 Edit… → 一一設定：Position 為 0.5 × 0.5；Dimension 為 20 × 15；選取 ☑ Axis on Buttom；☑ Axis on Left；☑ Scale Bounding Box；☑ Draw Box around Curve；☑ Show Tags on the Right；☑ Show Annotation。同理，我們可以反複 Tags 與 Annotation 的設定以得到最適當的圖形外觀。

將 Spectrum 加上底影 (shadow)

50. 單響左方面板的 ◆Basic icon。
51. 單響左方面板的 Create rectangle icon → 使用滑鼠左鍵並以 “drag-and-drop” 的方式畫出一個任意的矩形 → 按滑鼠右鍵並選 Edit… → 定此矩形的 Dimension 值與 spectrum 相同 → 移動此矩形使之與 spectrum 重合 → 按住 Shift 鍵不放並單響 spectrum 以同時選取此矩形與 spectrum → 單響上方的 Group button。
52. 再畫出一個與 spectrum 大小相同的矩形 → 移動此矩形使之位於 spectrum 的偏右下方。
53. 於此矩形上按滑鼠右鍵並選 Edit… → 單響 Basic → 單響 ◆Fill 以及單響顏色盤的黑色框 → 於 Fill Style: 選 ▬ 樣式→ 單響 OK → 單響 OK。
54. 按滑鼠右鍵並為此矩形選擇 Lower ⇒ 如此矩形就會位於 spectrum 下層。

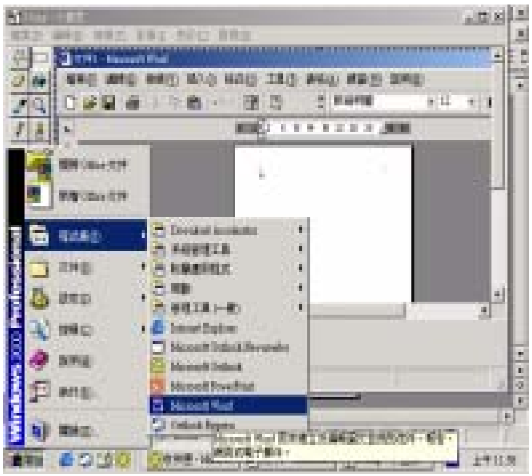
將由 XWIN-PLOT 所建立的 NMR 圖譜以電子郵件的方式傳送給對方

如果我們是在 Windows NT/2000 作業系統下執行 XWIN-NMR 的相關應用軟體

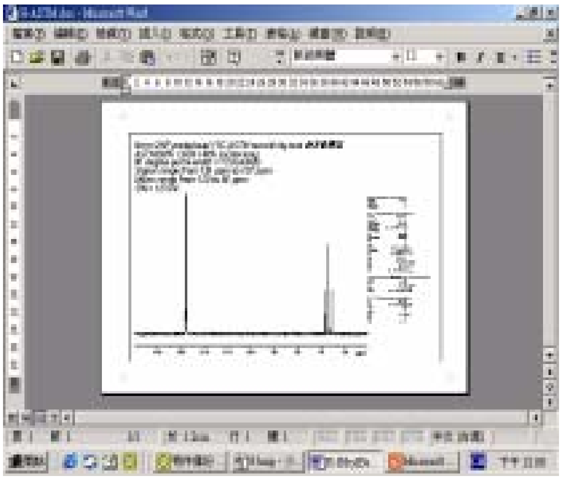
(XWIN-NMR 的大多數應用軟體有 UNIX 及 Windows NT/2000 兩種版本)，則可以利用 “Copy-and-Paste” 或是 “圖形檔” 的方式將資訊相互傳遞至 Office 2000 的所有應用軟體上。以下是介紹如何透過網路將 NMR 圖譜傳遞至 Word 2000 上；之後在 Word 2000 上經由 Outlook 將 NMR 圖譜以 e-mail 的方式傳遞至其他人的電子信箱內。如此一來可以比傳真的方式更直接且明確的傳遞圖譜。由 Word 建立郵件的方式有兩種，您的電腦需要有 Word 2000 及 Microsoft Outlook 2000 (或是 Outlook Express)。

<方法一>

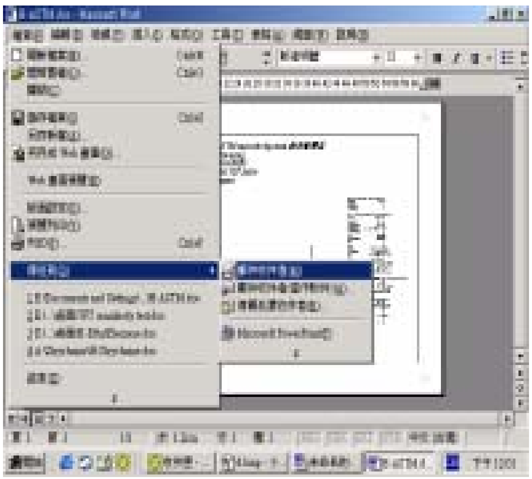
1. 由 程式集 開啟 Word 2000 程式



2. 開啟一個有圖譜的 Word 檔案



3. 選擇 傳送到 → 郵件收件者



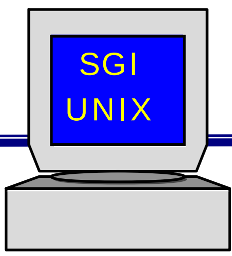
4. 變成電子郵件格式

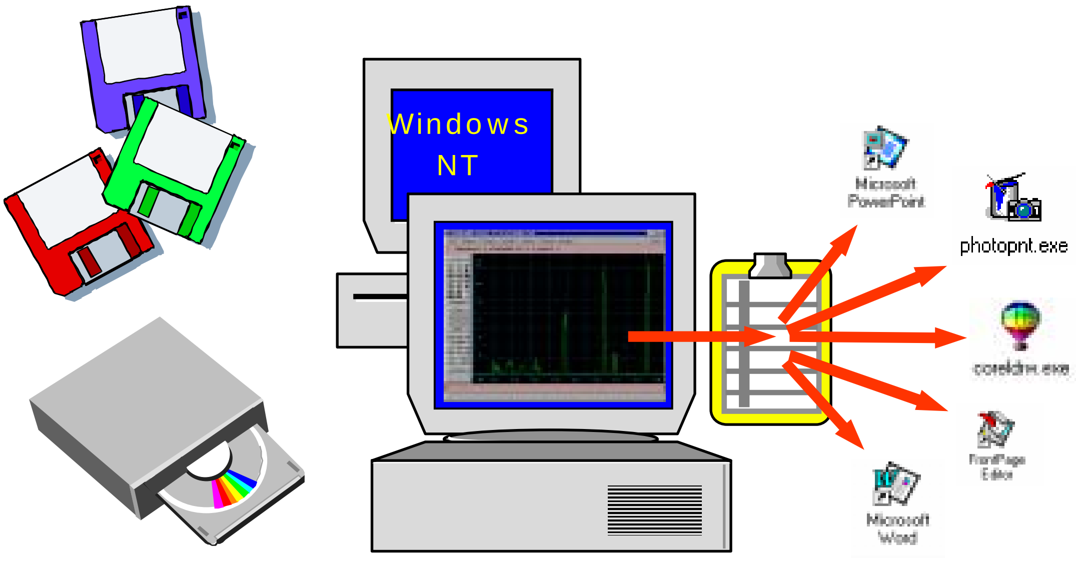
§4 BRUKER *AVANCE* NMR 波譜儀設計邏輯

由於高低能階上的原子核分布差異極小，造成了 NMR 訊號靈敏度的微弱；又因為 NMR 頻譜的化學位移頻率分布範圍很窄，所以 NMR 對於頻譜解析度的要求比其他的分析儀器來得高。基於對訊號靈敏度與頻譜解析度這兩個因素的考量，BRUKER *AVANCE* NMR 波譜儀在高解析 NMR 的研發上有許多優越的軟硬體設計。以下我們將描述一些常用於 BRUKER *AVANCE* NMR 的應用軟體以及 BRUKER 在硬體設計上對 NMR 實驗的靈敏度、解析度、以及一些方便的內部設定做基本的介紹。

BRUKER *AVANCE* NMR 作業系統

首先在作業系統上，BRUKER *AVANCE* NMR 除了可以在 SGI UNIX 下處理實驗之外，BRUKER 也同時編寫了一套適用於 Windows NT 工作站的 XWINNMR 應用程式。不論是在 SGI UNIX 或是 Windows NT 上工作，兩者的 XWINNMR 界面操作方式及其功能可以說幾乎完全相同，這使得我們在學習及使用上完全沒有適應上的困擾。而由於這兩種作業系統所得到的資料具有相同的格式，因此經由 `xftp/ws_ftp` 予以資料傳遞後可以直接使用，完全沒有相容性的問題。此外，在 Windows NT 作業系統上的 XWINNMR 資料還擁有以下幾個在 SGI UNIX 所沒有的特點：第一是 “Copy-and-Paste” 的應用。我們可以將由 XWINNMR suite 所得到的資訊予以拷貝至剪貼簿 (clipboard) 上，之後再貼到所需要的地方 (像是 Wordpad)。第二點是其與 Microsoft Office 相容軟體的利用。由於此時我們使用 Windows NT 作為作業系統，所以和支援 Widows NT 的應用軟體 (像是 Word、PowerPoint…) 都可以互通訊息。第三點是中文環境。如果我們在處理 NMR 資料時是使用中文的 Windows NT 作為作業系統，則可以將中文的解說文字附加在 NMR 資料上。像一般的 NMR 海報製作、中文論文的寫作 … 等等都可以附上中文的說明。譬如說本使用手冊的製作即是利用上述三點將所獲得的 NMR 圖形以 “Copy-and-Paste” 的方式先傳遞至 Word、CorelDraw 或是 PowerPoint，之後再予以編寫的。還有一點是儲存上的便利性。使用者在 Windows NT 環境中可以選擇以硬碟、磁片、ZIP 或是 MO 片予以儲存，因此不僅便利而且經濟。當然，Windows NT 的實用性不僅於此，像它與各種機器的相容性高也使得在以後的配備升級上更具競爭性 (圖二十七)。



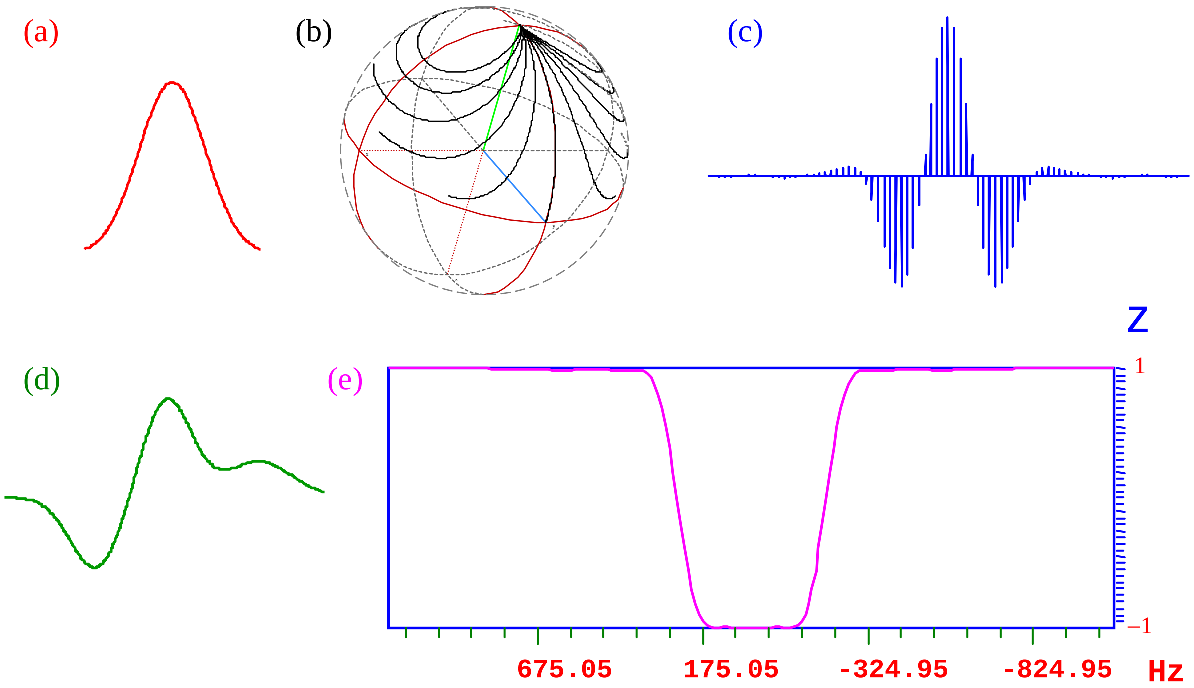


圖二十七： 由 XWINNMR for NT 版所獲得的 NMR 圖譜可以藉由 “Copy-and-Paste” 的方式予以輸出至支援 Microsoft Office 的相關軟體 (CorelDraw、Word、PowerPoint、Excel、FrameMaker、Alchemy 2000、Adobe Illustrator、ChemDraw …)，並且可以使用磁片作為小型圖譜的儲存以及使用硬碟、ZIP 或是 MO 片作為大量資料的備份。

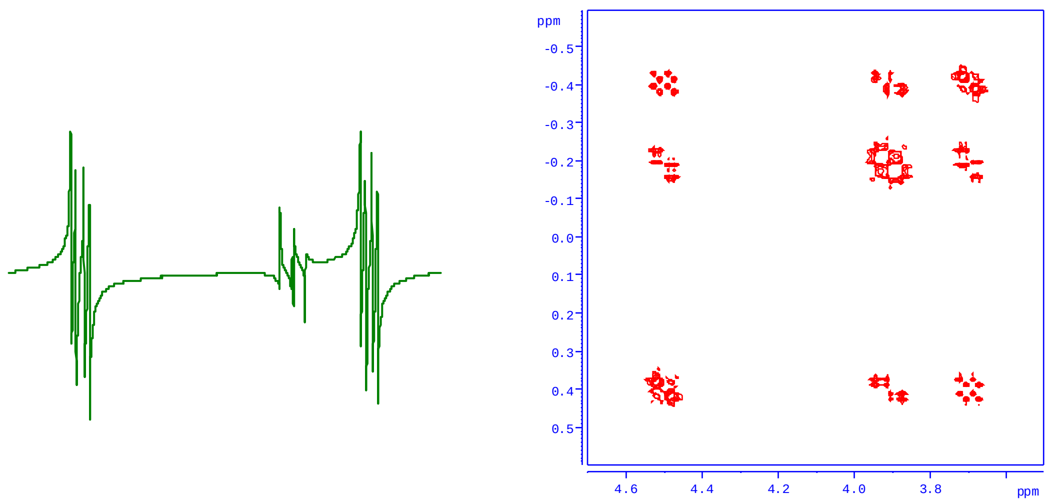
BRUKER *AVANCE* NMR suite 應用軟體組

本節中我們將針對 BRUKER *AVANCE* 系列的核磁共振波譜儀的應用軟體做一簡單的介紹。一套所謂的 *AVANCE* NMR suite 應用軟體大致上包含 XWINNMR、NMRSIM 以及 XWINPLOT 三個重要部分。其中 XWINNMR 是核磁共振波譜儀的主程式，可用來控制 NMR 實驗訊號的收集、資料的處理、以及一般的頻譜列印。NMRSIM 是一套電腦模擬軟體，其下分成兩大部分：Bloch simulator 與電腦模擬實驗。Bloch simulator 可以模擬磁矩受各式各樣波型 (waveform) 脈衝激發時的演化情形。例如說我們可以藉由 NMRSIM 的計算，得知平常所使用的 Gaussian 脈衝 (Gaussian pulse) 其涵蓋的頻率範圍會因為脈衝時間的長短而有所不同，並且其對不同的頻率偏移值 (frequency offset) 有類似於 Gaussian 的形狀；而如果要均勻的對一小段區間做反置 (inverse) 激發時，則可以依 NMRSIM 的模擬計算結果來採用 G3 的選擇性脈衝 (selective pulse) 作為更好的選擇 (圖二十八)。至於電腦模擬實驗部分則是假設在某一指定的自旋系統以及指定的起始條件之下，依據一組收訊參數以及經歷脈衝程序作用後計算所得到的結果。圖二十九 (a) (b) 分別是假設一個具有三個互相具有 J-耦合作用的自旋系統在經歷了一個 選擇性脈

衝/方波脈衝 的激發並且在 COSY 脈衝程序下以 NMRSIM 應用軟體所模擬出的結果。有興趣的讀者請與作者聯絡以得到詳細的使用說明。



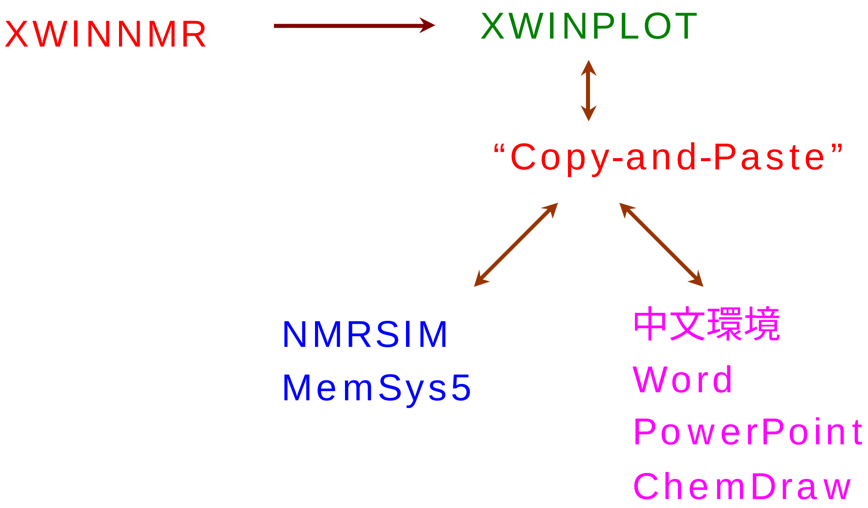
圖二十八： (a) 單獨一個 Gaussian 脈衝；(b) 不同頻率偏移值磁矩受 Gaussian 脈衝時演化的路徑；(c) 不同頻率偏移值磁矩受 Gaussian 脈衝時的頻率對應圖；(d) 一個 512 usec 的 G3 脈衝 (由三個 Gauss 脈衝所組合而成)；(e) 該 G3 脈衝對於不同頻率偏移值磁矩的 Z 方向影響圖。



圖二十九： (a) 假設具有三個互相具有 J-耦合作用的自旋-1/2 系統在經歷了一個選擇性脈衝的激發作用於 COSY 脈衝程序下以 NMRSIM 所模擬出的一維 COSY 結果；(b) 上述系統的二維 COSY 實驗模擬圖。

XWINPLOT 是 *AVANCE* NMR 的專屬繪圖程式，可以畫出由 XWINNMR 及 NMRSIM … 所獲得的圖譜。雖然 XWINPLOT 本身具有自己的 post-script 資料格式，

然而只要經過 “Copy-and-Paste” 的方式，則可以將圖形轉換成剪貼簿所支援的 bitmapped 或是 PICT 圖形格式 (圖三十)，操作部分請參考第 32 頁起的詳細說明。



圖三十：XWINPLOT 與其它應用軟體資料傳遞的相關圖。

BRUKER *AVANCE* NMR 波譜儀在訊號靈敏度上的考量

如果我們視 NMR 波譜儀的靈敏度 R(ω) 為訊號與雜訊之間的比值的話 (簡稱為訊雜比)，則依據工業界的定義，$R(\omega) = S_P(\omega)/2N(\omega)$ 是 NMR 波譜學家努力提升的目標。此處 $S_P(\omega)$ 代表由電磁波脈衝所得到在頻率空間上的訊號強度，而 N(ω) 為該頻率空間上均方根雜訊 (root-mean-square noise) 的強度。在理想的收訊條件以及最佳化 (optimized) 後的參數處理之下，NMR 樣品於收訊線圈上的 R(ω) 值可以表示如下：

$$R(\omega) = \left(\frac{\gamma\eta^2 I(I+1)}{24k^{3/2}\mu_0^{1/2}}\right)\left(\frac{N\omega^{3/2}(T_2^*)^{1/2}}{T^{3/2}}\right)\left(\frac{2\xi^2\rho Q V_c}{\lambda F}\right)^{1/2}\sin\alpha$$

上式等號右方第一項與 γ 值成正比，因此在固態 NMR 實驗中我們採用所謂 cross-polarization (CP) 的磁矩轉移方式將磁矩自較靈敏的原子核傳遞至較低靈敏度的原子核；而在液態 NMR 一維譜實驗中我們利用 J-耦合/NOE 作用將磁矩自較高靈敏度的原子核傳遞至較低靈敏度的原子核以利偵測。在液態 NMR 異核二維譜實驗中採用 “反

式探頭” (inverse probehead) 以及配合 “環遊式極化轉移” (round-trip polarization transfer) 的脈衝程式技巧來針對異核二維譜中靈敏度較高的氫核作偵測。

等號右方第二項的 N 代表樣品管內單位體積中的自旋原子核數目。通常研究人員是以改進純化技術和提高樣品濃度來達成。為了使原子核儘量接近收訊線圈以感應出最大的訊號強度，稀薄濃度樣品的使用者常採用特殊設計的樣品管 (如 SHIGEMI 樣品管) 或是使用較大口徑的樣品管做實驗。一般利用時間平均 (time-averaging) 的概念來增加掃瞄次數以達到較高的訊雜比值也是十分常用的方式。ω 代表 Larmor 旋進頻率，它與外加靜磁場的強度成正比，而這也是使用者希望在較高磁場下做實驗以期達到較高訊雜比值的原因之一。T_2^* 受超導磁鐵磁場均勻度、電磁波脈衝均勻度以及使用者勻場技巧的影響，所以我們分別採用超屏蔽 (Ultra-shield) 磁鐵、穩定的射頻 (radiofrequency) 系統、以及正交式 (orthogonal) 的勻場系統 (shim system) 來克服這些不完美的因素。絕對溫度 T 方面則與當時的實驗環境有關。雖然在較低溫環境下會有較大的原子核分布差值，但是由於其 T_1 值也可能因此而升高而使得整體實驗的靈敏度受影響。

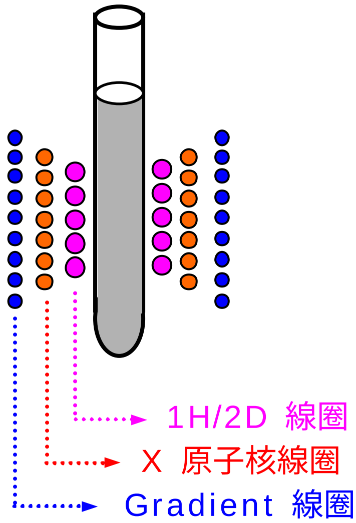
等號右方第三項的 Q 值是 BRUKER NMR 研發部門對探頭設計上一貫的努力目標，一般可達到 200 ~ 250。如果採用 LC-NMR 或是 Cryoprobe 的話，其值可大幅的增加。特別要注意的是分母部分的雜訊值 F，如果不注意相容性上的匹配考量，則可能雖然訊號隨 Q 值增加但雜訊也同時被收集起來，反而造成訊雜比降低的不利因素 [例如說，如果我們所使用的 NMR 系統是以組裝 (assembly) 的方式而非原廠一致性的研發]。與動力範圍 (dynamic range) 相關的 ρ 值可藉由 digital filtering 與 oversampling 技術予以提昇進而增加訊雜比值、防止訊號的回疊 (folding/aliasing) 以及 O1 spike 的產生。V_c 是收訊線圈內之樣品體積，所以當樣品濃度極低時可改用 8/10 mm 直徑的樣品管。以下各部分的介紹，主要是針對增進靈敏度作為考量。

❁ 探頭 (Probehead)

在磁鐵的核心有一組勻場線圈 (shim coil)，在線圈裡面放著探頭。探頭是一個圓柱形

金屬管，從探頭可以發射電磁波脈衝至樣品上，而產生的 NMR 訊號也由探頭接收 (圖三十一)。探頭可以區分成標準探頭與反式探頭。標準探頭像是 DUAL、QNP、BBO、 …，是將適用於測量靈敏度不高的 X 原子核線圈置於內層，所以較適用於一般非氫核的一維譜實驗；反式探頭像是 SEI、TXI、TBI、BBI … ，是將測量氫原子核的線圈置於內層，所以適用於一維氫譜實驗以及多維譜反式 (inverse) 實驗 (表四)。





圖三十一： 一個 BRUKER 探頭的圖片。(右) 當內層線圈用於氫核時稱之為反式探頭 (inverse probehead)；(左) 一個 DUAL 探頭的圖案。當內層線圈用於非氫的原子核 (統稱為 X 原子核) 時稱之為標準探頭 (normal probehead)。

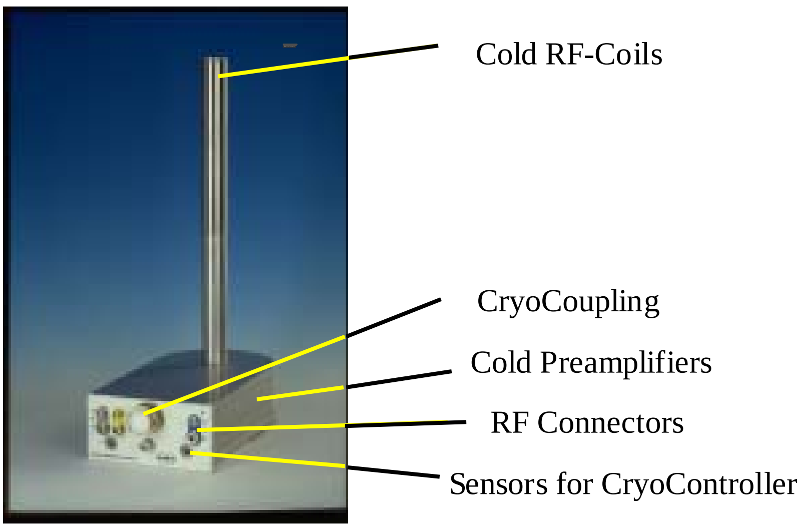
異核二維譜實驗的相對實驗靈敏度比較		
實驗	1H/13C	1H/15N
Direct observation	1	1
Direct + Gradient	> 4	> 9.9
Inverse correlation	31.6	306
Inverse + Gradient	> 120	> 1200

表四： 異核二維譜實驗的相對靈敏度比較。Direct observation 是傳統舊式的異核二維譜實驗方法；(Direct + Gradient) 是配備磁場梯度的改良式傳統實驗：(Inverse correlation) 是以反式探頭測量的異核二維譜實驗：配合反式探頭與磁場梯度的 (Inverse + Gradient) 實驗可獲得最大的靈敏度。

探頭通常由磁鐵底部放入，樣品管則由磁鐵上方慢慢地放下 (由氣體控制)。此時，樣品管、探頭及勻場線圈保持在室溫。依實驗需要，我們可以調整恆溫器來控制三者的

溫度以配合變溫實驗的需求。BRUKER 提供多種不同功能配備的探頭以供選擇。對氫譜實驗而言，如果使用氫核專用探頭 (即所謂的反式探頭，inverse probehead) 可以對氫核得到最大的靈敏度 (sensitivity)；但是在大部分的實驗室中，也常需要量測碳譜，因此使用二元探頭 (dual probe) 是較好的選擇。雖然這意味著我們必須犧牲氫核靈敏度的 60 ~ 300 %，但卻也因此可以避免更換探頭、重新調諧 (tuning)、和重新勻場這些煩人的困擾。假使我們需要量測 ^{13}C 及 ^{1}H 以外的原子核 (例如 ^{19}F，^{31}P …等等)，則可以使用寬頻多核探頭 (BroadBand Observation probehead，簡稱為 BBO 探頭)。探頭有各式各樣的口徑 (2.5 mm，5 mm，8 mm，10 mm，15 mm 及 20 mm)。對寬口徑 (wide bore) 的磁鐵而言，探頭的口徑可以大到容納老鼠以進行某些生化上的活體實驗。對大多數的樣品管實驗而言，一般都使用 5/2.5 mm 口徑的探頭；只有對溶解度比較小的樣品才選用 8/10 mm 口徑的探頭以增加自旋原子核的數目。通常口徑較小的探頭容易得到較好的磁場均勻度。

目前 BRUKER NMR 製造部門已投入發展超導及低磁化率材料的研發並獲致相當的成效。這一類的探頭稱之為 Cryoprobe (圖三十二)。譬如說以 600 MHZ 的 SEL 探頭為例，0.1% ethylbenzene in $CDCl_3$ 樣品的氫譜訊雜比值已大於 4000 且能過濾掉大部分的雜訊。另外，因為探頭要能均勻地發射脈衝以及接收從樣品溶液來的電磁波頻率 (radiofrequncy) 訊號，因此脈衝磁場的均勻度愈高愈好。

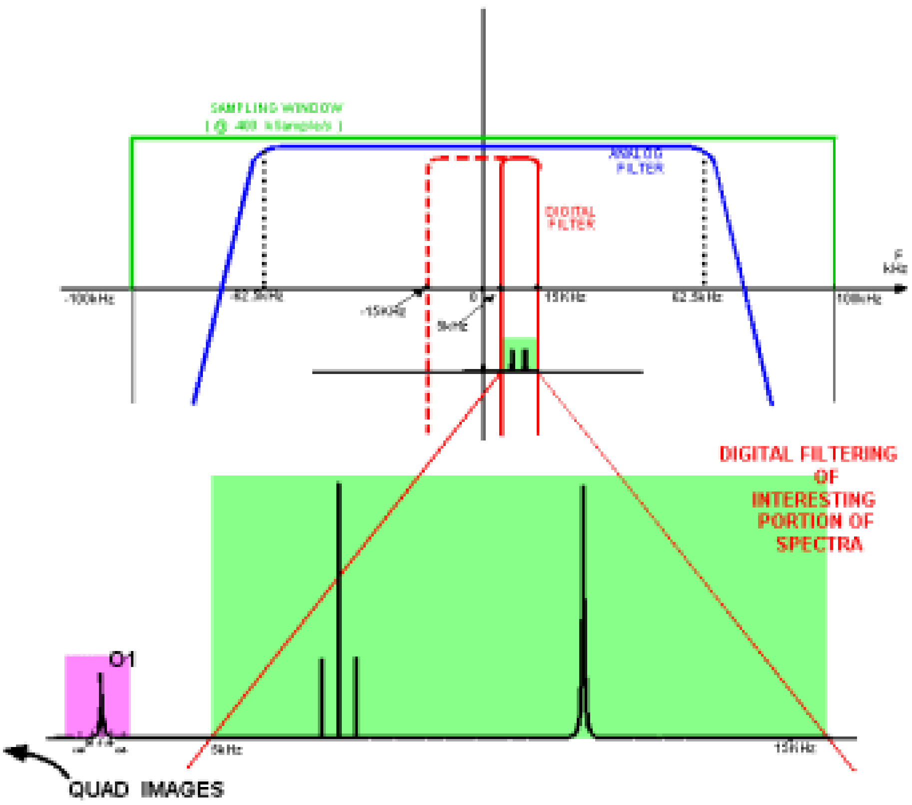


圖三十二：Cryoprobe 的示意圖。

數位式過濾 (Digital filtering) 與過量取樣 (Oversampling)

由於我們有興趣的化學位移範圍是相當的窄而脈衝激發所涵蓋的頻率範圍是十分的

大，所以必需將感興趣的區間予以保留而將其他的頻率部分予以過濾掉。傳統的類比過濾方式 (analog filtering) 除了會造成不感興趣區間的訊號回疊之外還會造成基線相位的扭曲，此外它的過濾效果也不佳。BRUKER 所設計的數位式過濾方法其 “Cut-off” 值為 100 dB 遠超過傳統類比過濾方式的 3 dB, 所以可以幾乎過濾掉在設定頻譜區間以外的其它訊號，避免了訊號回疊的現象。這對於在多維頻譜實驗中訊號 (FID) 被嚴重截斷 (truncated) 的先天缺陷有實值上的幫助。此外，BRUKER 在 Oversampling 方面所使用的技術是所謂的 “Real-time” processing 的方式。它除了不多佔記憶體容量、減少收訊所需的時間、不造成基線相位的扭曲及更精確的積分值之外，一般在速率上也比 “Post” processing 的 Oversampling 方式快 20 倍左右。不僅如此，Oversampling 在 Amplitude resolution 上約可增加 2 bit，而在 S/N 值上約可增加 5 ~ 30%。數位式過濾與過量取樣的示意圖見圖三十三；表五說明了它們在實驗上的優點。



圖三十三：BRUKER 公司特殊設計的 digital filtering 與 oversampling。

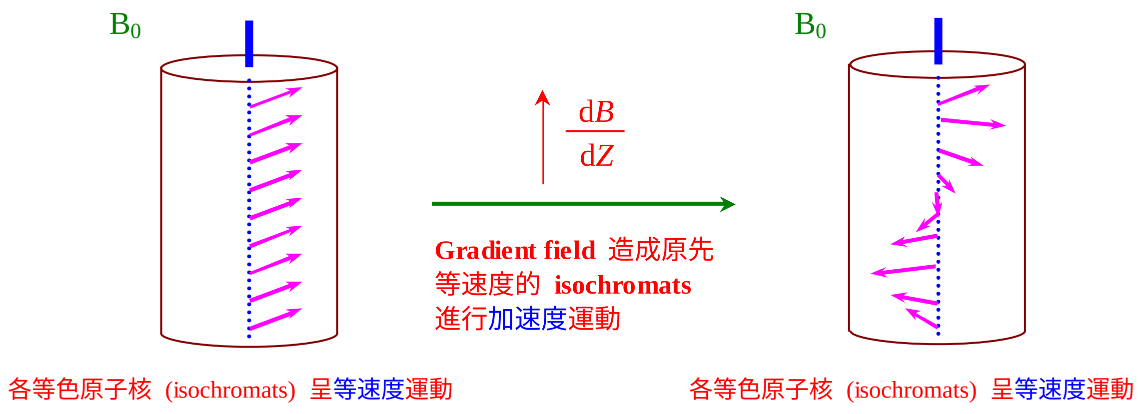
	傳統式的 Analog filters	Digital filter with oversampling

Cut-offs	3 dB point attenuation	100 dB attenuation
S/N ratio	80 : 1	200 : 1
Dynamic range*	16 bit	18 bit

表五： 在一般最大的取樣速率 $BW_{sampleing}$ = 200 KHz 之下，而一個典型的氫譜其譜寬不大於 BW_{eff} = 10 KHz 之下，動力範圍受過量取樣的增加值等於 $(BW_{sample}/BW_{eff})^{1/2}$。

❁ 脈衝式磁場梯度 (Pulse Field Gradient，PFG)

所謂的脈衝磁場梯度指的是加諸另外的磁場強度而且此磁場強度值會隨著空間座標的不同而有規則地 增/減 其值 (圖三十四)。一般我們以 G_Z 來代表在 Z 方向的磁場梯度的強度值，$G_Z = \Delta B_0/dZ$，其單位一般是 "高斯/公分" (G/cm)。在擴散 (diffusion) 實驗中，BRUKER 可提供達 1200 G/cm 的磁場梯度強度；而大多數含磁場梯度的實驗其使用的磁場梯度強度最大值約為 50 ~ 60 G/cm。特別值得注意的是，只有當 G_X、G_Y 與 G_Z 之值一樣大時才可以執行所謂 "magic angle water suppression" 的功能。Magic angle water suppression 對於蛋白質分子的水溶液樣品及 3D 實驗而言是十分有利的工具。



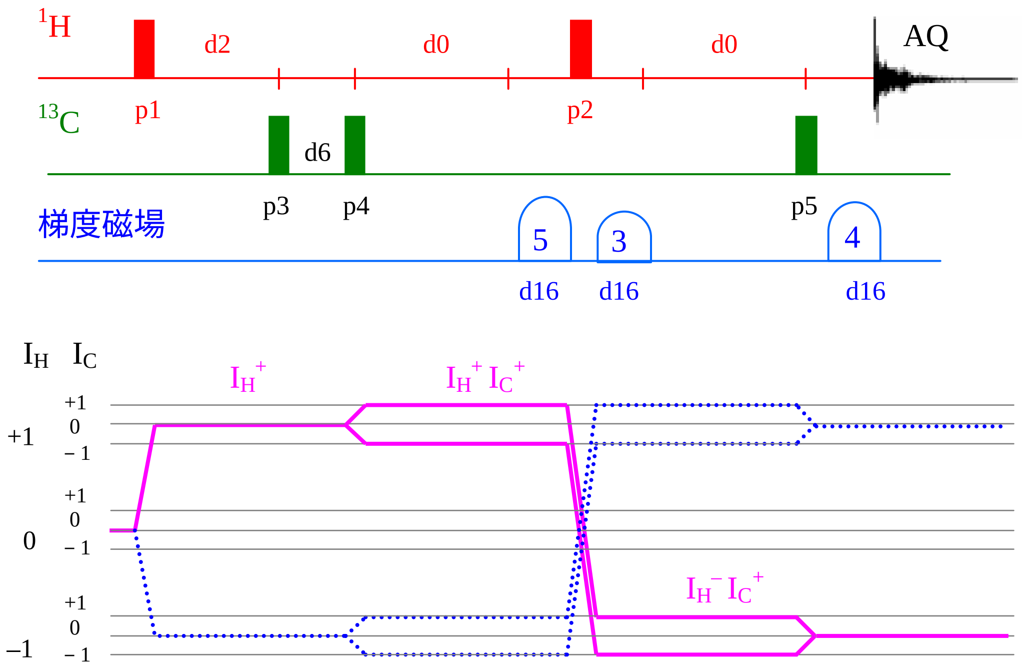
圖三十四： 磁場梯度的示意圖。除了超導磁鐵本身所產生的外加靜磁場 B_0 之外，磁場梯度線圈會在不同的 Z 方向空間位置上再附加一個不同強度的額外小磁場。因此在磁場梯度作用期間，不同的 Z 方向空間位置上的相同官能基原子核亦具有不同的 Larmor 進動速率。

脈衝磁場梯度已普遍成功地在磁振造影 (Magnetic Resonance Image，MRI) 上應用，作為區分不同空間位置的相同原子核。而一般在高解析脈衝實驗上，脈衝磁場梯度的用途約略可分成四大類：

1. 將磁矩相位均勻打亂的 homospoil purging；

2. 取代 phase cycling 作為 coherence pathway 選擇之用；
3. 測量分子擴散係數的擴散實驗之用；
4. 勻場。

上述第 1 類主要的用途是使自旋系統快一點達到 steady state 或是把殘留在某一方向的淨磁矩予以 “歸零”。第 2 類的脈衝磁場梯度廣泛用於多維頻譜實驗上以減少實驗所需時間，而且對於所謂的 t_1 雜訊 (t_1 noise) 的壓抑十分有效。一個具備脈衝磁場梯度的 HMBC 脈衝實驗如圖三十五所示。第 3 類的應用請參考 §23 擴散實驗操作指引。第 4 類的應用請參考 P.17 的磁場梯度勻場技術說明。



圖三十五：具磁場梯度的 HMBC 脈衝程序及同調轉移 (coherence transfer) 示意圖。

RUKER *AVANCE* NMR 波譜儀在頻譜解析度上的考量

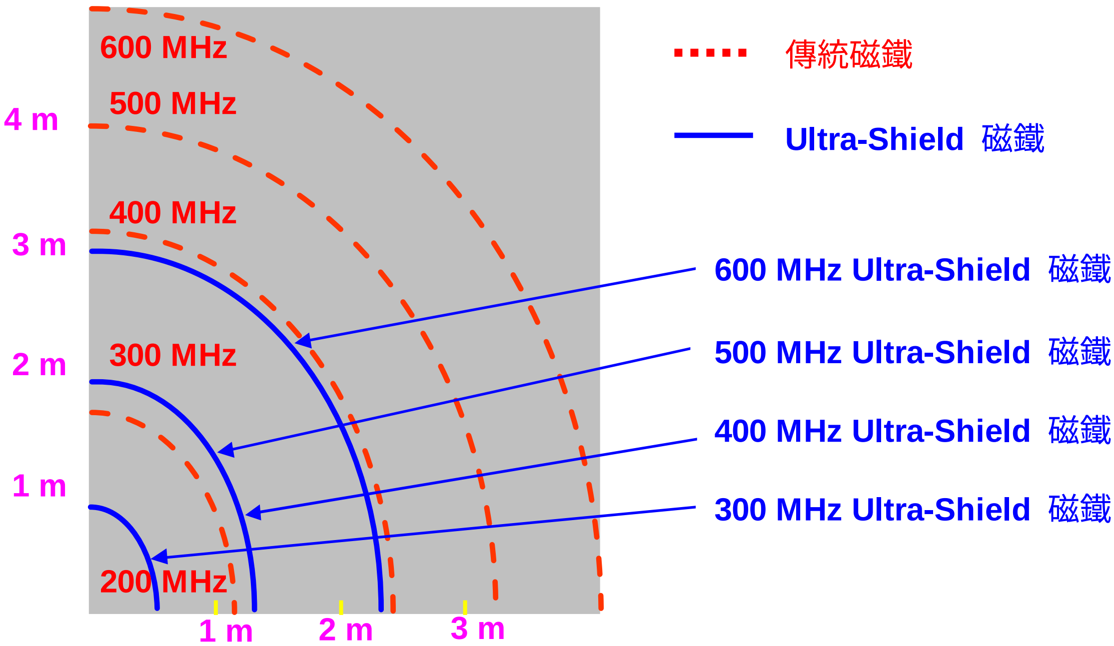
我們知道，構成高解析度 NMR 頻譜的因素不外乎 磁場/脈衝 的穩定度、J-耦合作用、去耦合作用、氘鎖定 … 等等硬體上與理論上的考量。至於在取樣後資料的處理，則是技巧上的應用。以下我們將針對影響高解析度 NMR 頻譜的常用觀念作一說明。

- **磁鐵部分 (Magnet)**

目前高磁場核磁共振儀其由超導磁鐵所產生的靜磁場強度已可達 21.14 Tesla (亦即氫原子核的旋進頻率達 900 MHz)。由於超導磁鐵幾乎沒有電阻，電流可以在線圈中不斷穩定地循環，而造成極為穩定的磁場。BRUKER 所提供的 Ultra-Shield 磁鐵 (圖三十六) 其十分小的 “5-高斯 漏散場半徑” (5-Gauss line stray field) 可保護使用者不受磁鐵靜磁場的影響以及保護實驗不受外界環境的干擾 (圖三十七)。



圖三十六：BRUKER Ultra-Shield 磁鐵的磁場逸散情形非常小，因此兩個 300 MHz 的磁鐵可十分接近而不會互相干擾，如此可增加空間的有效利用率。



圖三十七：傳統磁鐵與 BRUKER Ultra-Shield 磁鐵的 5-高斯 逸散場半徑比較圖。

❁ 數位解析度 (Digital resolution) 與頻譜解析度 (Spectral resolution)

所謂數位解析度 FIDRES = sw/si 值指的是二個資料點之間的頻率差。一般的高解析氫譜中通常要求頻譜解析度為 0.1 Hz，所以數位解析度太差的話會失去譜線的微細結構資訊。

要增加數位解析度有兩種方法：一種是保持資料點 si(或 td) 固定而縮小頻譜寬度 sw；另一種是保持頻譜寬度固定而增加資料點。後面的方法會犧牲靈敏度，因為增加資料點就增加收訊時間，所以在相同時間內我們所能掃瞄的次數就少了。在 ^{13}C-NMR 頻譜中一般不需要觀察到解析度十分好的譜線但需較高的靈敏度，因此數位解析度可減少至 1 ~ 3 Hz 而使得頻譜掃瞄次數可以多一些以增加訊號的靈敏度。

頻譜解析度指的是在頻譜上所能區分最接近兩根訊號之間的頻率差值。如果我們考慮吸收訊號具有寬度的事實，則兩根訊號之間應間隔 6 個數據點 (即數位解析度) 左右以防止兩根訊號併成一根訊號。在數據處理上，我們常使用 si = td 的零填滿 (zero filling) 技巧使頻譜的解析度達到最大並同時增加訊號的靈敏度。對於像氫譜之類對解析度的需要極高，一般我們多半使用 0.1 ≤ lb ≤ 0.3 Hz 之值。

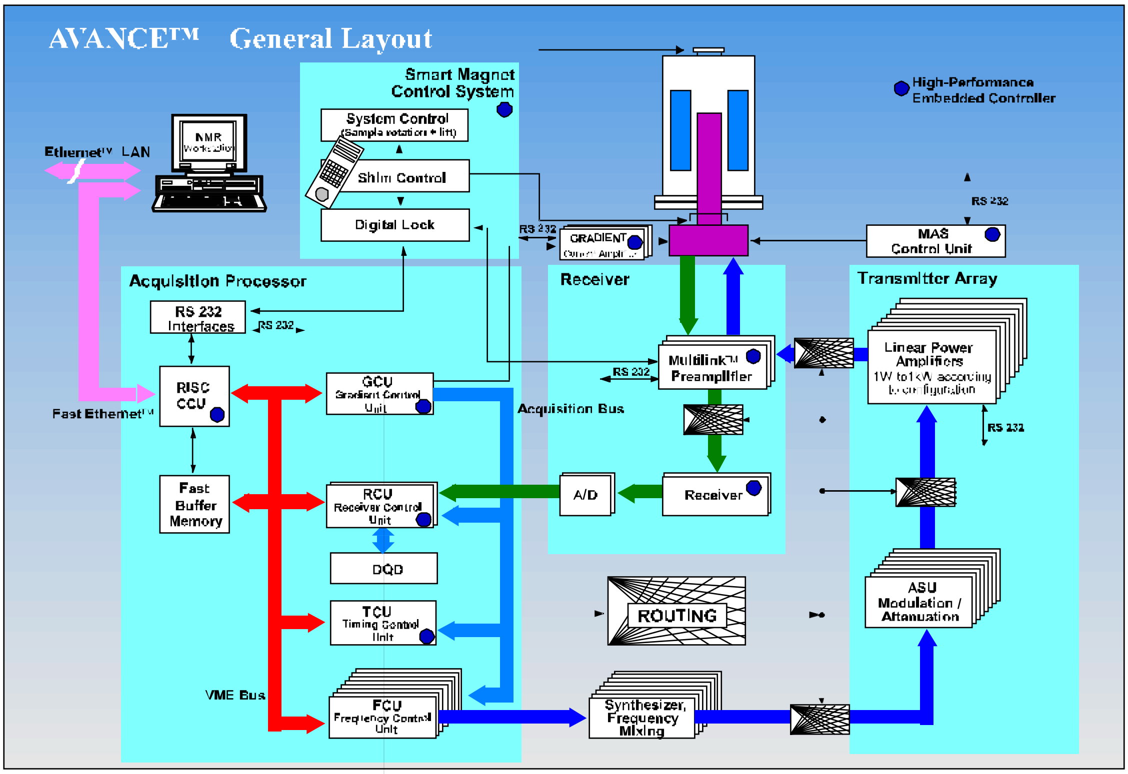
在執行對解析度要求極高的頻譜實驗時，為避免一些不需要的振盪 (fluctuation)，必需使用均勻度好的電磁波脈衝系統、將實驗環境予以做恆溫前處理、在磁鐵的下方裝置防止振動的減振器 (vibration damper) …。事實上，BRUKER 所使用的數位式氘鎖定 (digital lock) 技術 (請參見圖十七) 更是增加實驗穩定性以及保持高頻譜解析度的利器。

對於實驗結果 FID 的資料處理方面，除了一般的零填滿技巧之外，在固態 NMR 以及液態的多維譜實驗中我們也常使用線性預測 (圖二十五) 的方式來增加頻譜的解析度。對於受制於軟硬體配備而無法達到的頻譜解析度，就必需使用數學的模擬計算軟體 “最大熵方法” (Maximum Entropy Method，MEM) 予以計算之。有興趣的讀者請與作者聯絡。

❁ 模組化與數位化 (Modulation and Digitization)

在軟硬體的設計方面，自 1993 年 BRUKER 研發出 *AVANCE* NMR波譜儀機型引進了 NMR 數位化的概念以來，BRUKER 同時且一貫地開發出適用於不同研究領域的各種相關機種以及配合各類研究需要的相關軟硬體。至今，BRUKER 所出產的 NMR 波譜儀除作業系統採用較適用於圖形處理的 Silicon Graphics UNIX 或是使用大家熟悉的 Windows NT 作業系統 (圖二十七) 之外，其餘各軟硬體零組件部分皆由本身的研發部門自行生產，因此在功能執行上完全沒有相容性的問題。

此外，模組化 (module) 的概念讓使用者可以依目前最新的科技進展來局部地更新所需要的零組件配備以降低使用者在配備升級時的花費以及增加工程師的維護效率。數位化與模組化是 BRUKER NMR 波譜儀領先的成就，並提供使用者更值得信賴的服務品質 (圖三十八)。



圖三十八：BRUKER *AVANCE* NMR 的模組化示意圖。所有的控制單元像 ASU (Amplitude control and Setting Unit)、CCU (Communication Control Unit)、FCU (Frequency Control Unit)、GCU (Gradient Control Unit)、RCU (Receiver Control Unit)、TCU (Time Control Unit) 等皆已模組化。

BRUKER NMR 所提供的數位化程度大致可分為下列幾大部分：

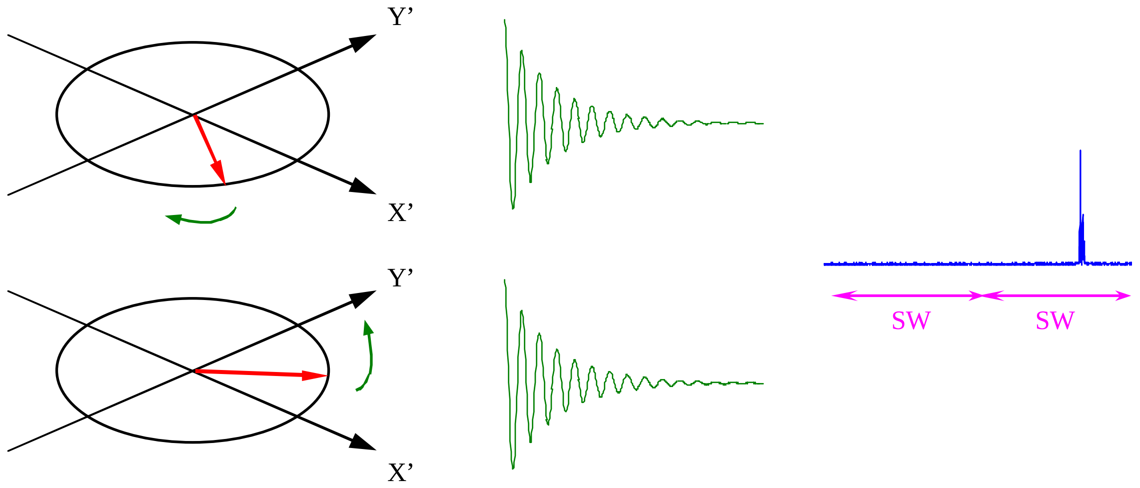
1. 數位化過濾頻率 (digital filtering) 並加以oversampling 以及數位化取訊號；
2. 數位化四相位偵測 (digital quadrature detection，DQD)；
3. 數位化頻率鎖定 (digital lock)；
4. 數位化勻場控制 (digital shim control，BOSS I/BOSS II/ WB BOSS)；
5. 數位化訊號處理 (digital acquisition processor)；
6. 數位化溫度控制系統 (BRUKER digital temperature control unit，BDTC)；
7. 數位化電磁波前置放大器控制 (digital controlled RF-preamplifier)；
8. 數位化放大器功率控制 (digital controlled power amplifier)。

四相位偵測 (Quadrature Detection)

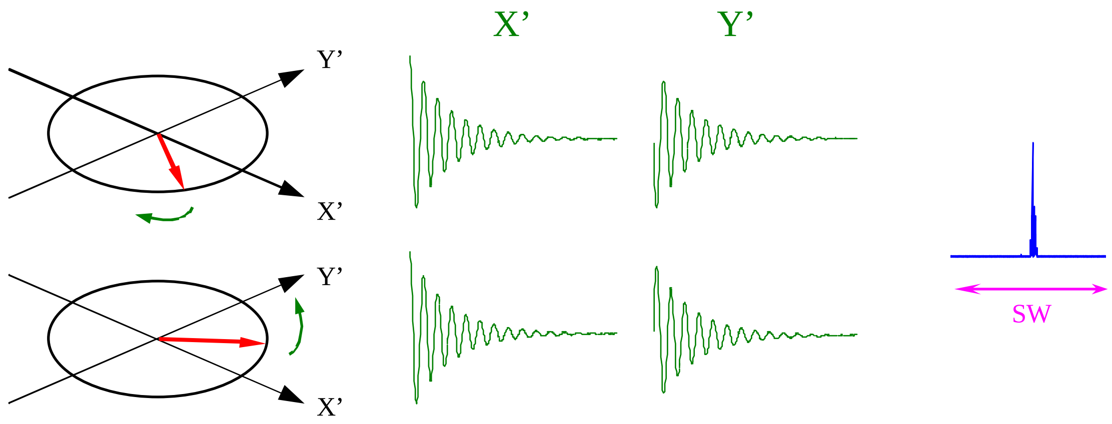
在單相位偵測的 "旋轉座標" (rotating frame) 上，偵測器本身是以 "載頻" (carrier frequency) 的速率旋轉，所以偵測到的是頻率差 ($\omega - \omega_0$)。此頻率差就對應到偵測核種的旋進頻率或 "化學位移" (chemical shift)。假使收訊時，參考頻率定在頻譜的某一邊界值，這種的偵測方式叫做 "單相位偵測法" (single detection method)；假使收訊時，參考頻率定在頻譜的中央, 則這種的偵測方式叫做 "四相位偵測法" (quadrature detection method)。圖三十九顯示, 二個速率相同而方向相反的訊號具有相同的 X' 成份但是不同的 Y' 成份。在單相位偵測法中由於只考慮訊號在 X' 方向的投影量，所以無法區分該兩頻率；利用四相位偵測就可分辨頻率的正負號了。這好比數學上決定角度的問題。假使我們只知道 sine 值或 cosine 值根本無法判斷角度的正負值，但假使我們同時知道 sine 與 cosine 的值，則角度就可以被正確的決定。此外在單相位偵測法中，如果以頻譜中心來看，其右邊為訊號而左邊為雜訊。由於左邊只含有雜訊，當它以 1:1 的方式加諸於正常的訊號上時，會使其訊雜比值 (S/N ratio) 比起四相位偵測法降低約 1.4 倍。在目前的 BRUKER 波譜儀實驗中，收訊參考頻率是設定在頻譜的中間並利用二個相位相差 90 度的 "相位敏感偵測器" (Phase Sensitive Detector，PSD) 來分辨頻率差的正負值。這種的四相位偵測法，所以其靈敏度會是單一偵測法的 1.4 倍。另一方面，BRUKER 波譜儀提供的 "數位化四相位偵測" (Digital Quadrature Detection，DQD) 技術除了上述優點外，更可消除所謂的 O1 spike 及 quadrature image (見第 46 頁，圖三十三)。

單相位偵測法

X'



四相位偵測法

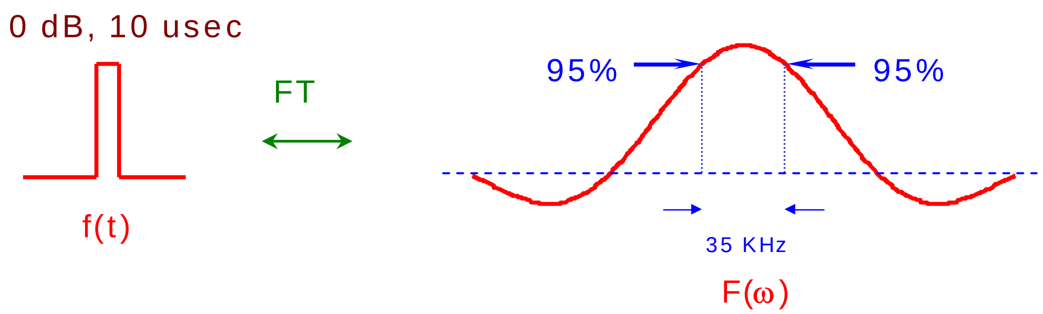


圖三十九： 單相位偵測 (上) 與四相位偵測 (下) 示意圖。在單相位偵測方式中由於無法以該參考軸 (X’) 來區分此兩種頻率，所以做法是將參考軸移向比此兩頻率都低的頻率參考軸。如此一來該兩種頻率與新的參考軸就具有不同的頻率差值，也因此得以被區分。在四相位偵測方式中，同時以 X’ 與Y’ 軸上的分量來作為區分之用。職是之故，在四相位偵測方式中其頻譜寬度只需要是單相位偵測方式的為的 0.5 倍即可。

選擇性脈衝 (Selective pulses)

所謂的方波脈衝指的是電磁波脈衝強度遠大於頻率偏差值的情形 ($B_1 >> \Delta F$)。如果以一個 10 usec 時間的方波脈衝去激發自旋系統時，則如圖四十所示，其 95% 的強度範圍涵蓋了約 35 KHz，因此不論需要與否一律激發了所有頻率區間內的吸收峰。但是方波脈衝的 Sinc 函數頻率涵蓋區間會延伸非常的廣泛而造成不希望被激發的訊號也一起

被影響。隨著外加靜磁場的增大，原子核的頻率分布範圍也愈來愈廣。如果此時我們想要做精確的定量實驗時，各個不同頻率偏差值的訊號必需被均勻的激發。所以說方波脈衝並不是理想的激發方式。如果我們考慮更大範圍的去耦合方式時，方波脈衝更不是理想的去耦合方式。



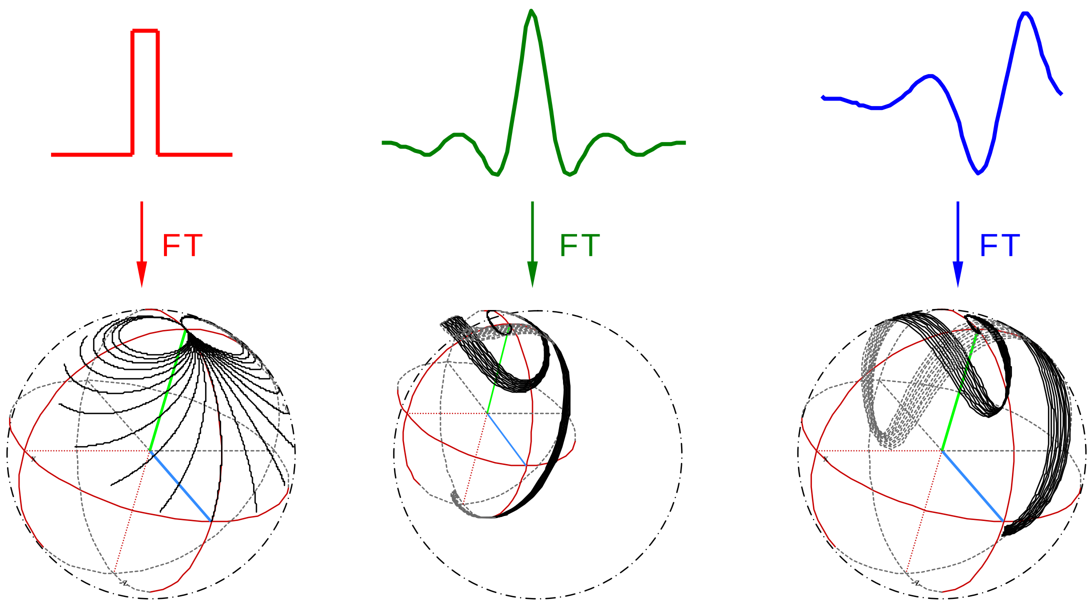
圖四十：時域空間 f(t) 中的一個 10 usec 脈衝所對應的頻率區間 F(ω)。

此外，是否我們可以千篇一律的使用方波脈衝來執行 COSY、NOESY、TOCSY、HSQC、HMQC、HMBC 等二維譜實驗來一次得到所有 through-band 或是 through-space 的資訊呢？答案雖然是肯定的，但是否需要每一次都把所有的資訊全部取出然後全部予以解答？試想如果我們於 homonuclear decoupling 中改採選擇性的飽和脈衝是否可減少其對實驗上的干擾？在 1D NOE 實驗中改以 180° 的 I-BURP-2 選擇性反轉脈衝取代原先的飽和脈衝是否除了減少在實驗上的干擾外還能提升 NOE 的靈敏度 2 倍？其它像 T_1 時間的測量與耦合常數 J 的測量在理論與實驗上的處理上，方波脈衝都遠比選擇性脈衝來得複雜多了，更不要說在水溶液樣品實驗中常使用的 WATERGATE 選擇性脈衝了。除此之外，選擇性脈衝還有：1. 減少實驗維度 (reduce dimension)、2. 將目標突顯 (focus topic)、3. 簡化問題 (simplify problem)、及 4. 減少實驗的時間與所需的記憶體空間 (save time/memory) 的優點。

選擇性脈衝的基本觀念十分簡單，其一是 “轉換定理” (transformation theorem)，另一個是 “線性程度” (linearity)。轉換定理告訴我們頻域空間 (Δω) 與時域空間 (Δt) 的乘積為一個定值：$\Delta\omega \cdot \Delta t = \text{constant}$，不同設計方式的選擇性脈衝皆有其不同的特殊定值。線性程度則提醒我們組合此選擇性脈衝的單位方波脈衝 (histogram cell) 的激發角度必須

十分的小以滿足 $\sin\theta \approx \theta$ 的關係，如此一來 Bloch 方程式 (Bloch equations) 才能與 Fourier 轉換式的結果一致。此外，基於方波脈衝的 Fourier 轉換是一個 Sinc-like 的頻率波型，如果我們反過來想，則一個 Sinc-like 的脈衝就應該激發出方波型式的頻率波型。所以說大多數的選擇性脈衝的波型多半像是 Sinc-like 或是半個 Sinc的形狀。

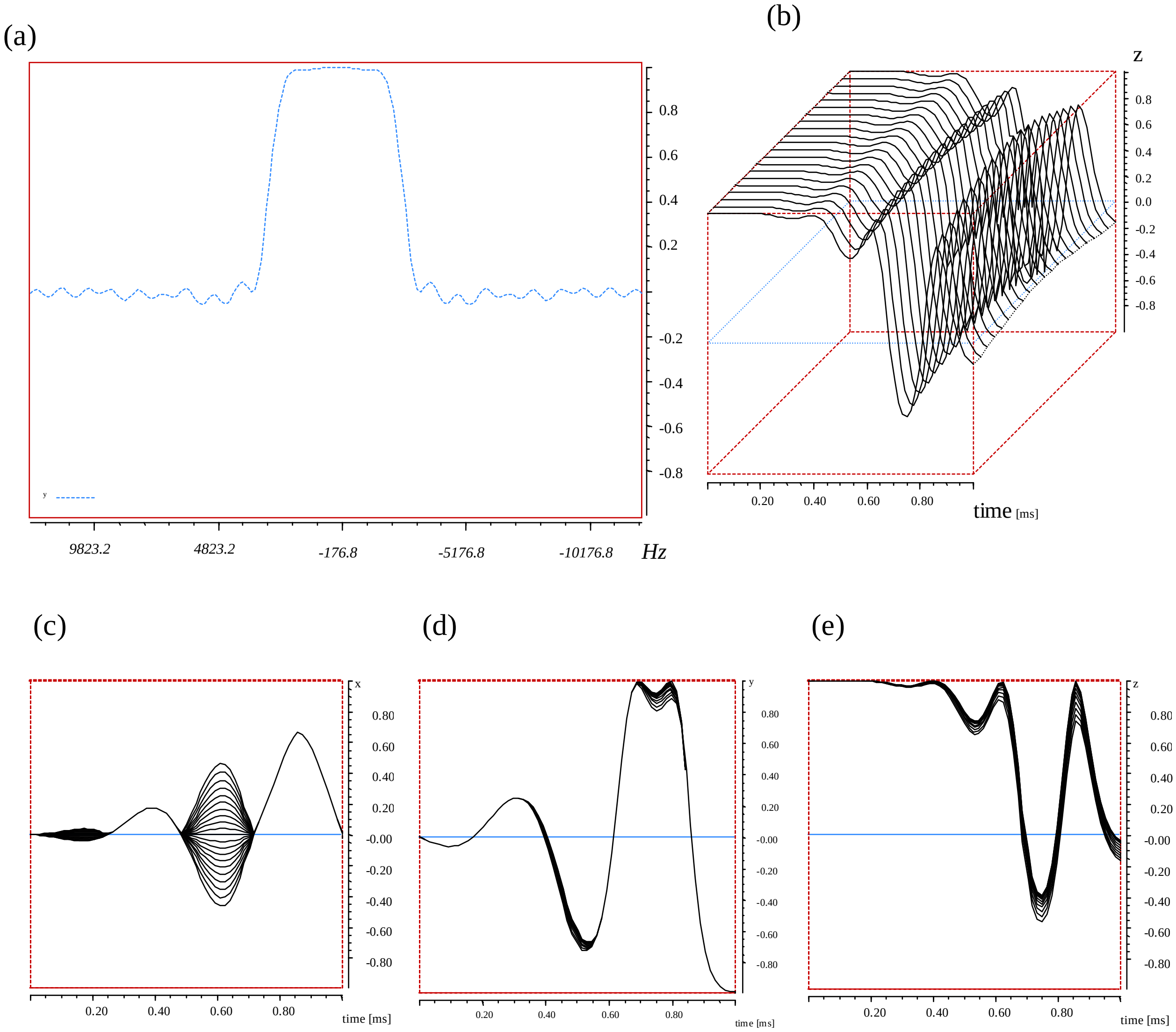
下面是一個 “方波脈衝” (hard pulse) 與 2 種常用的 “選擇性脈衝” (selective pulses) 對不同磁矩頻率偏差值的電腦模擬圖 (圖四十一)。每一個圖都代表在 1000 usec 時間內，從 +1000 Hz 到 –1000 Hz 頻率範圍內的磁矩受到方波脈衝與選擇性脈衝的激發時磁矩行進的路徑。對於方波脈衝而言，較大頻率偏差值 (offset) 的磁矩就無法到達 –Z 方向，而是依循 Sinc 函數的方式行進 (左)。由此可推斷方波脈衝並不適用於前述的寬頻式去耦合脈衝 (broadband decoupling)。選擇性脈衝的特性是，它們使用較長的脈衝時間以及較弱的能量來涵蓋更大的頻率範圍並且 “均勻地” 一律將它們從起始方向 (+Z) 激發至設定的終點方向。中央的 Sinc 脈衝常用於 MRI 頻率區間的切片上；右方的 E-BURP2 脈衝則作為 90° 的磁矩激發之用。



圖四十一： (左) 方波脈衝與其對不同頻率偏差值的影響；(中) Sinc 脈衝與其對不同頻率偏差值的影響；(右) E-BURP2 脈衝與其對不同頻率偏差值的影響；

由圖四十二的 E-BURP2 選擇性脈衝對不同頻率偏差值在 X、Y、及 Z 方向影響的電腦模擬圖可明白的看出選擇性脈衝比起方波脈衝更可以均勻且乾淨的激發所設定的頻

率區間而幾乎不影響其兩翼的頻率訊號。



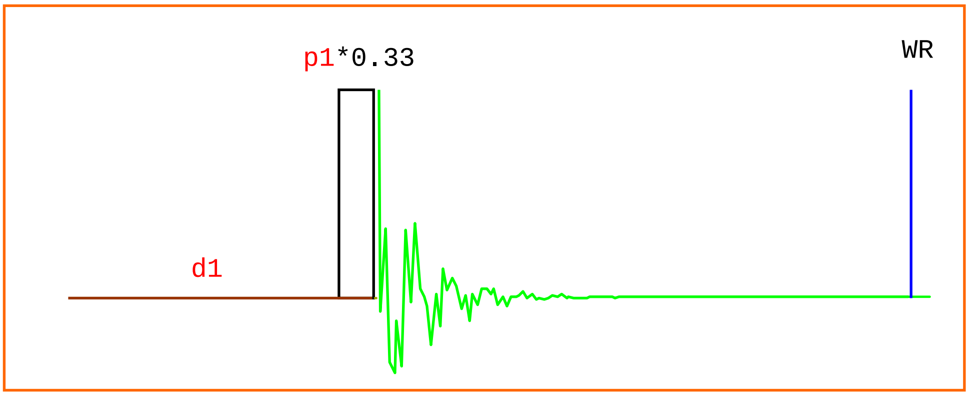
圖四十二： 1000 usec E-BURP2 脈衝對 –1000 至 1000 Hz 頻率區間的影響示意圖。(a) 經過脈衝後 X 方向磁矩與不同頻率偏差值之間的關係圖；(b) 不同頻率受 E-BURP2 脈衝影響的磁矩演化情形示意圖；(c) (d) (e) 則分別是不同頻率磁矩在 X、Y、Z 方向的演化的投影量示意圖。

選擇性脈衝並不是新的觀念，早期的 CW NMR 其實就是具選擇性的。至於其應用，業經 Ray Freeman 研究群自 1982 年以來的努力，也逐漸普及化。我們期望以一步一腳印的方式將選擇性脈衝予以普及化，並期待在下一個世紀的 2001 年 1 月看見它在台灣發揮功能。有興趣的讀者可參考 Ray Freeman 教授所著 “Spin Choreography” 的第 5 章以及聯絡作者有關於選擇性脈衝的理論、實驗、以及電腦模擬。

第II部分：常用一維頻譜實驗的操作說明

§5 一維氫譜實驗的基本操作指引

一維氫頻實驗的脈衝程序 **zg30** 如下圖所示。依下列步驟可得一維氫譜：



(i) 啟動工作站電腦之後，雙響 guest icon 以便登錄為一個稱為 “guest” 的使用者。

(ii) 選擇 Desktop → Open Unix Shell 以開啟一個 UNIX shell。

(iii) 於該UNIX shell (winterm) 內鍵入 *xwinnmr* 指令以啟動 XWINNMR 應用軟體。

(iv) 選擇 Window menu → BSMS display → 單響 Shim → 單響 Spin off 以停止樣品的旋轉，之後再單響 Lift on/off 以便將留在探頭內之樣品取出。

(v) 將自己的樣品管放於 spinner 內之後再放入 gauge 內調整樣品管的深度。

(vi) 將樣品管放至探頭上方後，再單響一次 Lift on/off 以便將樣品管送入探頭內。

(vii) 鍵入 *edc* 指令並為此次實驗設定其檔名 (NAME)、實驗名 (EXPNO) 及程序名 (PROCNO) ⇒ BRUKER 實驗是先設定檔案名稱再執行實驗。

(viii) 鍵入 *rpar* 指令並選擇 H_probe 以取得一組適用於氫譜的實驗參數。

(ix) 鍵入 *wobb* 指令並且調整收訊線圈的吸收頻率 (tune) 及阻抗值 (match)。

(x) 鍵入 *lock* 指令並選擇溶劑的種類。此時系統會自動做磁場鎖定的工作。

(xi) 如果您要得到非常高解析的結果，則必需做好勻場 (shimming) 的動作。

(xii) 鍵入 *ii* 指令來連繫軟體與硬體的設定。

(xiii) 鍵入 *rga* 指令，此時系統會自動做收訊線圈 rg 值的設定工作。

(xiv) 鍵入 *zg* 指令來執行 FID 訊號收集的動作。

(xv) 鍵入 *efp* 指令來依序執行視窗函數、快速 Fourier 轉換及相位設定的動作。

(xvi) 鍵入 *apk* 指令來自動執行零次方以及一次方相位修正的動作。

(xvii) 鍵入 *abs* 指令來執行基線修正以及自動積分的動作。

(xviii)鍵入 *setti* 指令並且為此實驗輸入其標題內容。

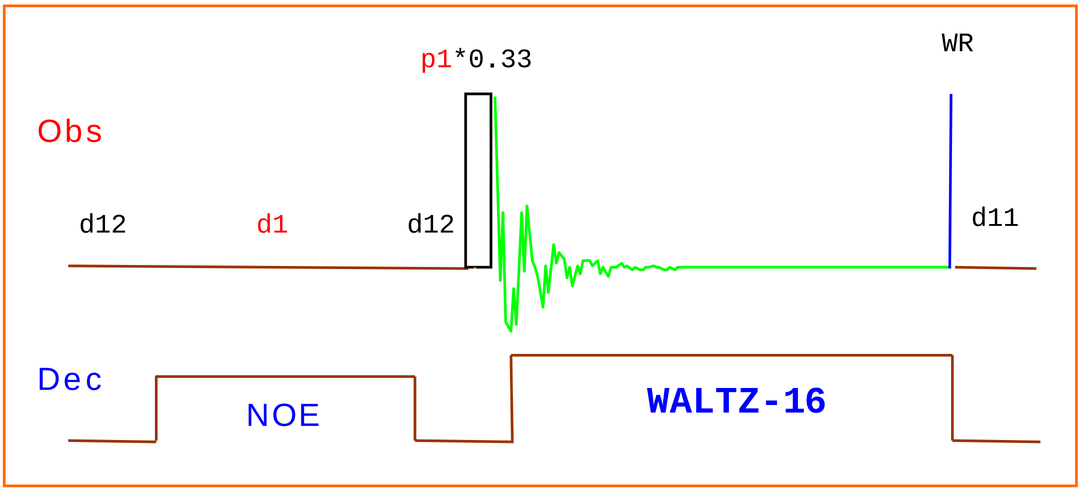
(xix) 鍵入 *view* 指令來預先觀察實驗頻譜的印出結果。

(xx) 鍵入 *plot* 指令來印出實驗結果。

附註：
(1) 此使用手冊假設我們所使用的 “login name” 為 “guest”，讀者於自行習作時必須將 guest 取代為您自己的 login name。
(2) *rpar* 參數檔的命名原則是前半部為脈衝實驗名稱而後半部為探頭名稱，中間以一個底線予以分隔之。
(3) 可鍵入 *rg* 指令來得知經 *rga* 指令處理後適合該實驗的吸收線圈放大倍率值 “rg” (Receiver Gain)。rg 值愈大表示該樣品的濃度愈低。依據經驗，一般定 ns = rg/16 ~ rg/8 以得到滿意靈敏度的氫譜。
(4) 當溶劑訊號的強度十分大時 (譬如說在水溶液或是稀薄溶液中)，必需先將溶劑訊號予以前處理 (詳見 §9 去水訊號實驗操作指引) 才能得到靈敏度佳的頻譜。
(5) 收訊時間 $AQ \propto TD * (2 * SW)^{-1}$，一般定 $0.9\ \text{sec} \le AQ \cong (4/3)\ \text{FID} \le 2\ \text{sec}$。
(6) 通常執行氫頻譜實驗時避免旋轉樣品以防 spinning sidebands 干擾頻譜。
(7) 可使用 *edg* 指令來修改所有列印參數之值以改善列印的外觀或是使用 XWINPLOT 繪圖軟體 (使用方法請詳見第 32 頁之繪圖使用說明)。
(8) 如果要執行積分的功能用來定量的比較不同化學位移位置的訊號之間的面積比時，應注意將 relaxation delay 時間 d1 值予以酌量放大或是再加上一些 dummy scan (ds) 值以防止由於磁矩受弛豫時間影響而未能回復至熱平衡時的 Boltzmann 分布。
(9) 再三提醒，欲比較兩張頻譜圖時必需確定兩者的 sw 值、o1 值與 sr 值完全相同。

§6 一維去氫耦合碳譜 $^{13}C\{^{1}H\}$ 實驗的基本操作指引

一維去氫耦合 **(proton-decoupled)** 碳譜實驗的脈衝程序 **zgpg30** 如下圖所示。依下列步驟可得一維去氫耦合碳譜：



(i) 啟動工作站電腦之後，雙響 guest icon 以便登錄為一個稱為 “guest” 的使用者。

(ii) 選擇 Desktop → Open Unix Shell 以開啟一個 UNIX shell。

(iii) 於該UNIX shell (winterm) 內鍵入 *xwinnmr* 指令以啟動 XWINNMR 應用軟體。

(iv) 於 XWINNMR 應用軟體中選擇 Window menu → BSMS panel → 單響 Shim → 單響 Spin on/off 以停止樣品的旋轉 → 單響 Lock on/off 以終止樣品的氘鎖定，之後再單響 Lift on/off 以便將留在探頭內之樣品取出。

(v) 將自己的樣品管放於 spinner 內之後再放入 gauge 內調整樣品管的深度。

(vi) 將樣品管放至探頭上方後，再單響一次 Lift on/off 以便將樣品管送入探頭內。

(vii) 鍵入 *edc* 指令並為此次實驗設定其檔名 (NAME)、實驗名 (EXPNO) 及程序名 (PROCNO) ⇒ BRUKER 實驗是先定檔案名稱再執行實驗。

(viii) 鍵入 *rpar* 指令並選擇 C13_probe 以取得適用於去氫耦合碳譜的實驗參數。

(ix) 鍵入 *wobb* 指令並且調整收訊線圈的吸收頻率值 (tune) 及阻抗值 (match)。

(x) 選擇 Window menu → BSMS display → 單響 Shim → 單響 Spin on 以旋轉樣品。

(xi) 鍵入 *lock* 指令並選擇溶劑的種類，此時系統會自動做磁場鎖定的工作。

(xii) 如果您要得到非常高解析的結果，則必需做勻場 (shimming) 的動作。

(xiii) 鍵入 *ii* 指令來連繫軟體與硬體的設定。

(xiv) 鍵入 *rga* 指令，此時系統會自動做收訊線圈 rg 值的校正工作。

(xv) 鍵入 *zg* 指令來執行訊號收集的動作。

(xvi) 鍵入 *efp* 指令來執行加權函數、快速 Fourier 轉換及相位設定的動作。

(xvii) 鍵入 *apk* 指令來自動執行零次方以及一次方相位校正的動作。

(xviii)鍵入 *abs* 指令來執行基線修正的動作。

(xix) 鍵入 *setti* 指令並且為此實驗輸入其標題內容。

(xx) 鍵入 *view* 指令來預先觀察實驗頻譜的印出結果。

(xxi) 鍵入 *plot* 指令來印出實驗結果。

附註： (1) 對碳譜而言，經 *rga* 指令處理後所得的 rg 值通常只適用於最強的溶濟訊號而非我們有興趣的稀薄樣品訊號。使用者可視情況自定 rg 值在 $4k \le rg \le 8k$ 之間，過大的 rg 值會造成 amplifier 的 overflow。

(2) 為了讓樣品能感受到較佳的磁場均勻度，執行碳譜實驗時通常旋轉樣品。

(3) 在執行長時間的碳譜實驗時，可同時執行自動勻場 (autoshim) 的功能以隨時提升磁場的均勻度。

(4) 收訊時間 $AQ \propto TD * (2 * SW)^{-1}$，一般定 $0.9\ sec \le AQ \cong (4/3)\ FID \le 2\ sec$。

(5) 我們可以鍵入 *tr* 指令以 “複製” 出當時已執行完掃瞄次數的 FID 訊號並依序以 *efp* → *apk* 指令來觀察當時的結果是否滿意。如果已滿意，可以鍵入 *halt* 或是 *stop* 指令來中止實驗的繼續進行。

(6) 一維譜中，由 *halt* 或是 *stop* 指令所中止的實驗可以用 *go* 指令來繼續實驗的進行。

(7) 因為碳譜通常不需要高解析度且碳譜所涵蓋的範圍可達 250 ppm，所以不太需要執行 zero filling 的技巧。但 lb 值仍不應過大 (一般而言 $1 \le lb \le 3$)。

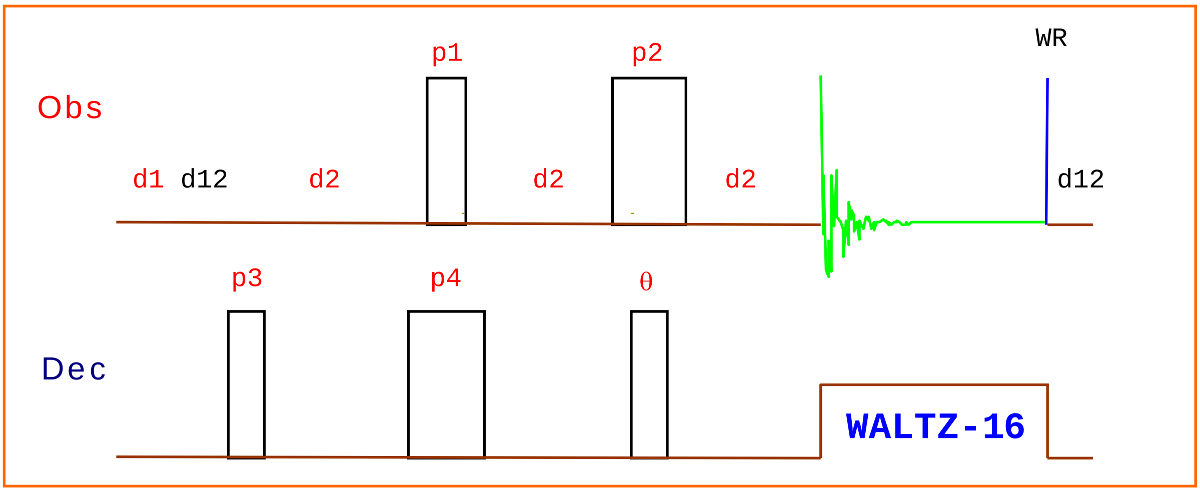
(8) 由於執行碳譜實驗有利用到 NOE 磁矩轉移的技巧，所以碳譜訊號的積分值比例並不與碳數的比例有絕對的關係 。

§7　DEPT 實驗操作指引

前言：　DEPT 是 Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 的簡稱。其方式是利用極性轉移的技術將較高靈敏度的氫磁矩藉由碳-氫間的 J-耦合作用轉移至靈敏度較低的碳上並且測量碳的訊號。藉由 DEPT-45 實驗可以得到 一、二、三 級碳的訊號；DEPT-90 實驗則只獲得三級碳的訊號；而 DEPT-135 實驗中，一、三的訊號為正值而二級碳的訊號為負值。配合前述去氫耦合碳譜的應用 (含四級碳的訊號)，可以讓我們區分該碳訊號是屬於幾級碳 (表六)。DEPT 實驗的脈衝程序 **dept** 與操作步驟如下所述：

實驗名稱	一級碳	二級碳	三級碳	四級碳
C13	+	+	+	+
DEPT-90	×	×	+	×
DEPT-135	+	–	+	×

表六：C13、DEPT-90、DEPT-135 實驗結果與碳的級數關係表。



(i)　鍵入 *edc* 指令並為此次實驗設定其檔名、實驗名及程序名。

(ii)　鍵入 *rpar* 指令並選擇　(a) DEPT-45_probe 以取得 DEPT-45 的實驗參數；
(b) DEPT-90_probe 以取得 DEPT-90 的實驗參數；
(c) DEPT-135_probe 以取得 DEPT-135 的實驗參數。

(iii)　鍵入 *wobb* 指令並且調整接收器線圈的吸收頻率值 (tune) 及阻抗值 (match)。

(iv) 選擇 Window menu → BSMS display → 單響 Shim → 單響 Spin on 以啟動樣品的旋轉。

(v) 鍵入 *lock* 指令並選擇溶劑的種類。此時系統會自動作磁場鎖定的工作。

(vi) 執行勻場 (shimming) 的動作。

(vii) 鍵入 *ii* 指令來連繫軟體與硬體的設定。

(viii) 鍵入 *rga* 指令，此時系統會自動做收訊線圈 rg 值的校正工作。

(ix) 鍵入 *zg* 指令來執行訊號收集的動作。

(x) 鍵入 *efp* 指令來執行譜線寬化、快速 Fourier 轉換及相位校正的動作。

(xi) 鍵入 *apk* 指令來執行自動相位校正的動作。

(xii) 鍵入 *abs* 指令來執行基線修正的動作。

(xiii) 鍵入 *setti* 指令並且為此實驗輸入其標題內容。

(xiv) 鍵入 *view* 指令來預先觀察實驗頻譜的印出結果。

(xv) 鍵入 *plot* 指令來印出實驗結果。

附註：(1) 如果頻譜有相位扭曲的現象，可試著修改 cnst2 (= $^1J_{CH}$) 值為 140 Hz 或 160 Hz 以修改耦合常數的平均值。

(2) DEPT 實驗需在 ^1H、^{13}C 的 90°/180° 脈衝激發以及 WALTZ-16 去氫耦合功能皆正常下才能得到良好的結果, 所以一般我們可以用 DEPT-135 實驗來確定儀器的功能正常與否。

(3) 因為四級碳沒有與氫直接相接，所以於 DEPT 實驗中皆不可見四級碳。

(4) DEPT 實驗中亦可以用 *go* 指令去累積訊號強度。

(5) 由於強大的 Solvent peak 在 DEPT 實驗中常常不可見，所以由 *rga* 指令所獲得的 rg 值就比較可信。

(6) DEPT-90 實驗中因為利用相位循環 (phase cycling) 的減差技巧常常無法將所有的一級碳與二級碳完全抵銷，所以在一級碳與二級碳的頻率位置上會留下一些 “殘留物”。

(7) 由於 DEPT 實驗需準確的激發角度，所以其 relaxation delay time d1 值也必需酌量增加，以防止減差技巧作用時誤差的產生。

(8) 除此之外我們也可以採用 “JANUS” 選擇性寬頻倒置 (selective broadband inversion) 脈衝來取代 cnst2 值以符合大範圍不同的 $^1J_{CH}$ 值。

§8 例行性的 H、C13、DEPT-90 及 DEPT-135 實驗操作指引

鑑於一般對氫譜的要求主要在於解析度而對碳譜的要求則在於靈敏度，因此對於例行性的 H、C13 及 DEPT 實驗，我們建議以下述 *multizg* 與自動勻場 (auto shimming) 的觀點針對同一個樣品管來增加其 NMR 波譜儀的使用效率以及改善頻譜的外觀。(假設我們已置入樣品管於所需的探頭中，並且先於不旋轉樣品管的狀況下完成了 wobble 的動作以及在旋轉樣品管的狀況下做初步的勻場動作。)

1. 先啟動樣品的旋轉再鍵入 *edc* 指令並於其內設定好檔案的路徑為 (譬如說) /Sample/1/1。
2. 鍵入 *rpar* H_probe all 指令以讀取一組適用於氫譜實驗的參數檔，並改設定其掃瞄次數 ns = 1。
3. 鍵入 *ii* → *rga* → *zg* ⇒ 觀察掃瞄次數等於 1 之下的氫譜結果。如果不滿意外形可先以 *rsh* 指令來讀取一組先前存入的勻場參數檔，再酌量執行勻場動作。
4. 選擇 Windows menu → BSMS panel → 單響 [Auto Shim] → 並設定 Z = 1、Z2 = 2、Z3 = 3 → 單響 [Auto Shim] 以執行自動勻場的動作。
5. 依序執行三次 *edc* 指令以開啟三個新檔並依序設定其檔案路徑分別為 /Sample/2/1、 /Sample/3/1、/Sample/4/1。
6. 於 /Sample/4/1 中以 *rpar* DEPT-135_probe all 來讀取一組適用 DEPT-135 實驗的參數檔並依序鍵入 *ii*、*rga* 來決定 rg 值以及修改掃瞄次數 ns 值。
7. 於 /Sample/3/1 中以 *rpar* DEPT-90_probe all 來讀取一組適用於 DEPT-90 實驗的參數檔並依序鍵入 *ii*、*rga* 來決定 rg 值以及修改掃瞄次數 ns 值。
8. 於 /Sample/2/1 中以 *rpar* C13_probe all 來讀取一組適用碳譜實驗的參數檔並依序鍵入 ii、rga 來決定 rg 值 (rg 視狀況而定) 以及修改掃瞄次數 ns 值。
9. 回到 /Sample/2/1 後鍵入 *multizg* 指令並且回答 3 以依序執行碳實驗、DEPT-90 實驗以及 DEPT-135 等 3 個實驗。
10. 等到步驟 9 完成之後，回到 /Sample/1/1 並停止樣品管旋轉以及修改 ns = 16 再鍵入 *zg*。此時由於經過長時間的 auto shimming，磁場的均勻度比起步驟 1 做實驗時為佳；而 ns = 16 也會使訊號的靈敏度上大 2 ~ 3 倍左右。

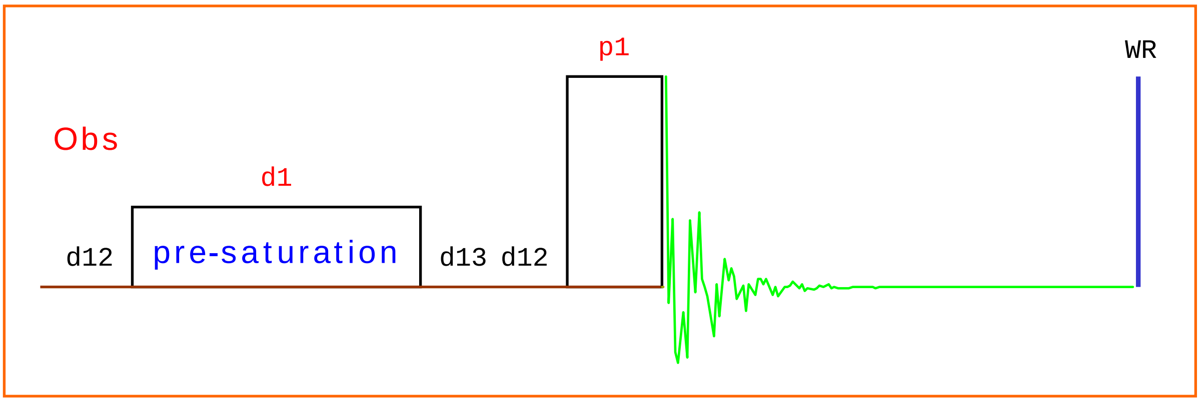
附註： 如果對 *multizg* 所得之頻譜不滿意，可酌加其 ns 值並且以 *go* 指令來增加訊號的 S/N ratio。

§9 去水訊號實驗操作指引

前言： 水分子訊號所造成的缺點可約略敘述如下：

1. Fourier 轉換式的 NMR 無法切除強大的水訊號，因此造成強度較小的訊號在 ADC 轉換 (audio-to-digital conversion) 過程中受動力範圍 (dynamic range) 的限制。
2. 水訊號產生的 radiation damping field 所造成的水訊號譜線寬化會使其旁的小訊號被遮蔽。此外該 damping field 亦會降低其它訊號的 T_2 值而造成其它訊號的譜線寬化。
3. 它與我們所關心的官能基訊號很容易有 chemical exchange 的現象產生。
4. 在一維及多維譜實驗中常造成基線扭曲 (baseline distortion) 及 t_1 雜訊 (t_1 noise) 的產生。
5. 大多數以 D_2O 來取代 H_2O 的方法由於其與 N-H 基的 chemical exchange 很慢，所以不適用於含 N-H 基的生化分子。雖然 cryogenic receiver 可增加探頭的 Q 值以及減少電子熱振動雜訊的強度，但因水分子仍然會造成 dielectric loss，所以訊號的靈敏度沒有預期的好。

一般處理壓抑水訊號的原則共分成終結 (termination) 與隔離 (isolation) 兩種。在多維譜實驗中常用於去除水訊號的 “WATERGATE” 技術是屬於後者，其缺點是在頻譜中對於水訊號週遭的訊號影響較大。此處所討論壓抑水訊號的做法是在取訊號之前予以前處理，以防止數位化雜訊 (digitization noise) 的產生。至於事後處理的壓抑水訊號的做法是另一種的處理邏輯，此處不予以討論。以下所述的 **zgpr** 脈衝程式是採用終結方式的做法, 先將水分子訊號予以預先飽和 (也就是說使在高能階與低能階上的水分子氫原子核有相同的分布)，較適用於一維頻譜的去除水訊號。其脈衝程序與實驗操作如下所述：



(i) 鍵入 *edc* 指令並為此次實驗設定其檔案目錄為 /ZGPR/1/1。

(ii) 鍵入 *rpar* 指令並選擇 H_probe 以取得一組適用於氫譜實驗的參數。

(iii) 鍵入 *wobb* 指令並且調整收訊線圈的吸收頻率值 (tune) 及可變阻抗值 (match)。

(iv) 鍵入 *lock* 指令並選擇溶劑種類。此時系統會自動作磁場鎖定的工作。

(v) 執行勻場 (shimming) 的動作。

(vi) 鍵入 *ii* 指令來連繫軟體與硬體的設定。

(vii) 鍵入 *rga* 指令，此時系統會自動做收訊線圈 RG 值的校正工作。

(viii) 鍵入 *zg* → *efp* → *apk* 來取得未壓抑水訊號時的一維氫譜。

由於此壓抑水訊號實驗的有效程度乃取決於基準值 (o1)，CW 時間(d1)、以及 CW 強度 (pl9)，所以我們逐項調整此三個實驗參數者之值予以最佳化 (optimize) 之。

(ix) 依序單響左方面板的 utilities → O1 以將水訊號的位置定為新的 o1 值並視樣品訊號所涵蓋的範圍來酌量增減 SW 值並且記錄此 o1 與 sw 值。

(x) 鍵入 *rpar* WaterSuppression_probe all 以取得一組適用於去水訊號的實驗參數 (此時我們的預設值為 pl9 = 58 dB、d1 = 1.5 sec)。

(xi) 輸入由步驟 ix 所得之 o1 與 sw 值之後依序鍵入 *zg* → *efp* → *apk* → *abs* 來初步取得去水一維氫譜。

先依步驟 (xi) 所得的頻譜結果來逐步調整 o1 之值。此時觀察水的訊號，直到水訊號被 “對稱性” 的壓抑時為最佳值。其次，如果水訊號被壓抑的情形不如我們所預期時 (譬如說水訊號的壓抑不足或是水訊號的壓抑過度而造成其附近的訊號被影響)，請先調整 pl9 之值 (儘量滿足 $55 \leq$ pl9 ≤ 65 dB)。如果調整 pl9 後仍然不滿意，可酌量加大 d1 值直到約 2 sec 左右。

(xii) 鍵入 *setti* 指令並且為此實驗輸入其標題內容。

(xiiii) 鍵入 *view* 指令來預先觀察實驗頻譜的印出結果。

(xiv) 鍵入 *plot* 指令來印出實驗結果。

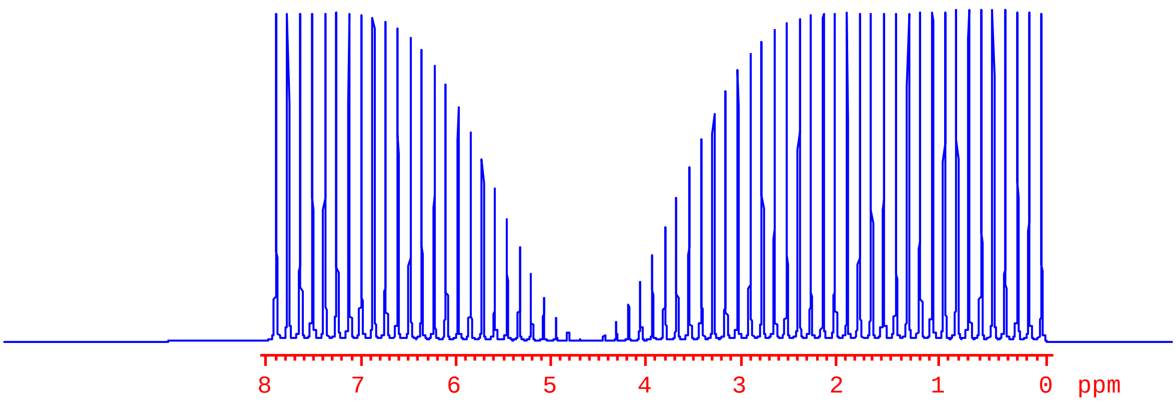
附註： (1) 參數值的最佳化 (optimize) 也可以使用 *paropt* 的指令方式來一一對

O1、pl9、d1 做調整。

(2) 2.5 版以後的 XWINNMR 中，可以改採用 **zgcppr** (使用組合式脈衝的方式來壓抑水訊號) 作為脈衝程式。採用 **zgcppr** 時其所有的實驗參數及實驗參數值皆與使用 **zgpr** 相同。一般而言此脈衝程式對於 pulse mis-calibration、field inhomogeneity … 等因素比較不敏感，因此 “可能” 得到較好的圖譜結果。

(3) 有時候使用 **noesypr1d** 脈衝程式也可得到很好的圖譜結果但需留意水訊號的相位可能有扭曲的情形發生。此時惟一與 **zgpr** 及 **zgcppr** 不同的參數僅在於增加了 d8 mixing time。在一般小分子樣品中我們設 200 msec ≤ d8 ≤ 650 msec。

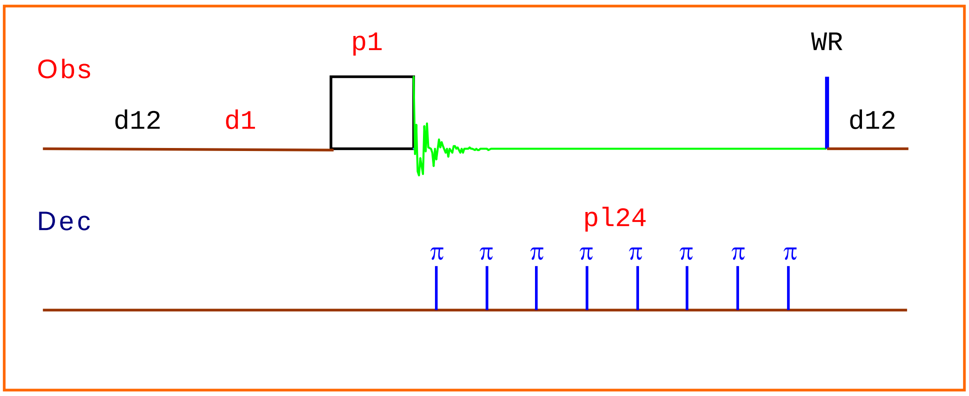
(4) WATERGATE 的電腦模擬結果如圖三十九所示。WATERGATE 較適用於多維譜的去水實驗。



圖三十九： WATERGATE 的電腦模擬圖。由模擬結果可以看出 WATERGATE 的激發方式會對鄰近水訊號的化學位移位置有所影響，所以較不適用於一維頻譜。然而由於WATERGATE 像是一個副程式可以安插於脈衝程式的任意位置，所以較適用於多維頻譜。

§10 同核種去耦合 (Homonuclear Decoupling) 實驗操作指引

前言： 當兩氫核之間的耦合常數 $J_{HH} \neq 0$ 時，則在收集訊號的同時由於兩者磁矩互相受到對方的耦合影響而會隨時間的演化造成在頻率空間上有分裂的情形。為了要確認在頻譜上不同頻率位置的吸收訊號是否存在有不為零的耦合常數，除了二維譜的 COSY 與 TOCSY 外，我們可以於收訊時將某一原子核予以在 XY 平面上執行去耦合動作使其訊號為零，則與此原子核有耦合作用的訊號也會因此從多重峰 (multiplet) 收斂成單重峰訊號 (singlet)。因此從某種角度而言，同核種去耦合實驗可以視為 COSY 實驗的 1D 版本，作為辨識不同吸收訊號是否有耦合作用的情形存在。與 COSY 比較起來，它的好處是靈敏度與解析度比較大。同核種去耦合方式的脈衝程序 **zghd** 與實驗操作如下所述：



(i) 首先以 *edc* 指令製造一個新的檔案目錄，之後以 *rpar* H_probe 讀取一組適用於氫譜實驗的參數檔並執行一個一維氫譜的實驗。之後移動游標至要做去耦合的頻率位置上並記下其頻率值作為以後實驗的 o2 值之用。

(ii) 鍵入 *edasp* 指令後選 NUC2 為 1H 核 → 單響 Save 以離開

(iii) 鍵入 *eda* 指令後，改 PULPROG = zghd、DIGMOD = homodecoupling-digital 以及在 o2 欄輸入由步驟 (i) 得到之值。

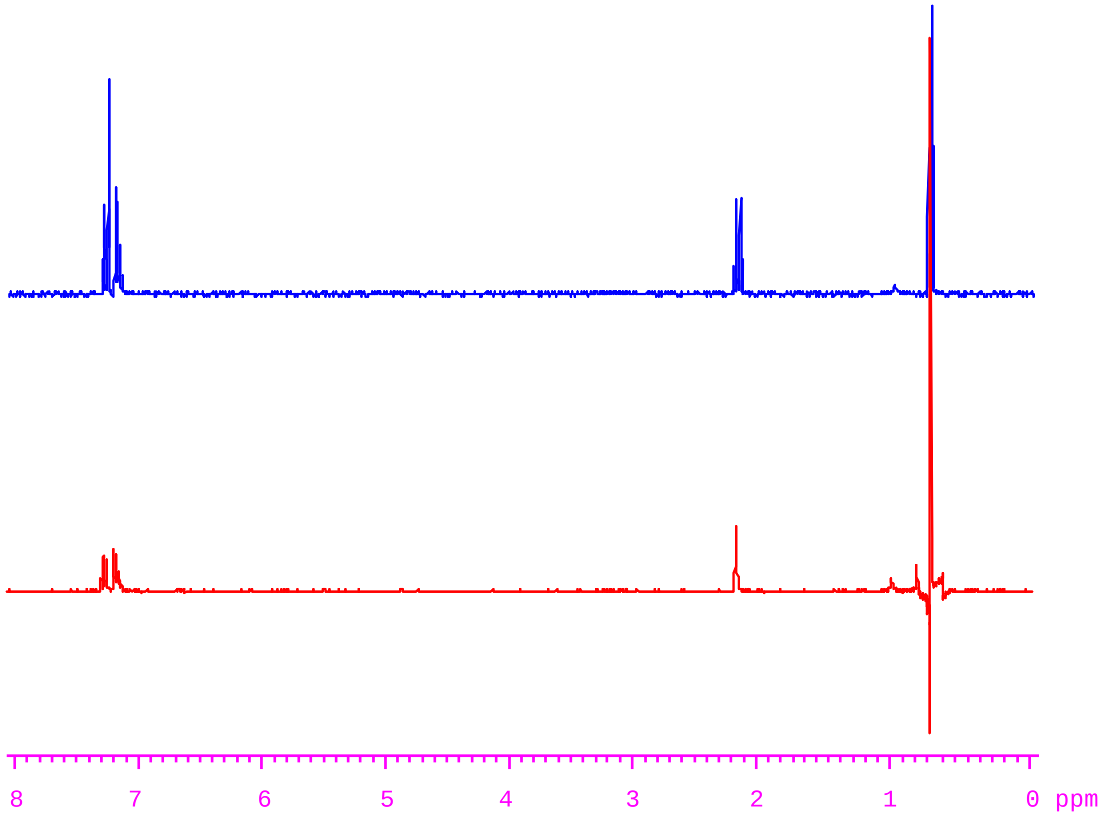
(iv) 鍵入 *paropt* 指令 → 鍵入 pl24 以示我們要對 pl24 之值作改變 → 輸入 40 作為起始值 → 輸入 2 作為遞增值 → 輸入 16 表示總共要做 16 次實驗。如此我們就指示要執行一系列 pl24 值從 40 到 70 dB (以 2 dB 為增加值) 的 16 個針對 o2 訊號做同核種去耦合方式的實驗。

(v) 觀察由步驟 (iv) 得到之結果，此時以 pl24 值最大 (i.e. 能量最弱) 而仍能將 o2 位置訊號予以去耦合者為佳。將此 pl24 值予以記下。

(vi) 鍵入 *rep 1* 指令以回到 processing number = 1的目錄下。

(vii) 輸入由步驟 (iv) 得到之 pl24 值，並執行 *zg* 指令即可。

圖四十是一個對 0.1% ethylbenzene 溶於 $CDCl_3$ 的樣品做 homonuclear decoupling 的例子。圖中顯示當我們對 $-CH_3$ group 予以做 homonuclear decoupling 時，$-CH_2$ group 的訊號會從四重峰 (triplet) 變成單重峰 (singlet)。



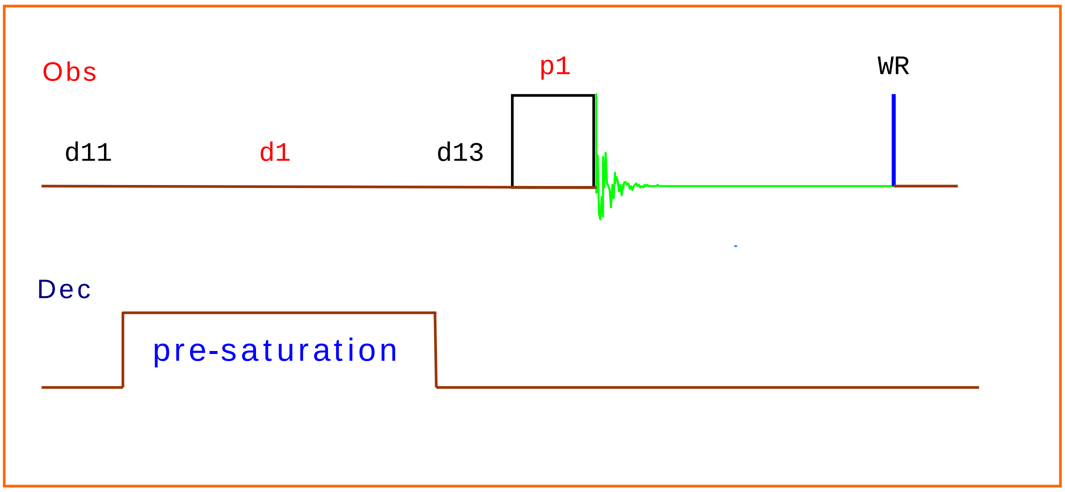
圖四十： 同核種去耦合實驗的實驗結果。上方是一般的氫譜圖。下方是將 $-CH_3$ 訊號予以在收集訊號時執行同核種去耦合作用的結果。由實驗結果可以立即確認 ethyl benzene 的 $-CH_2$ 與 $-CH_3$ 的氫原子核之間具有 $J_{HH} \neq 0$ 的事實。

附註： 由於同核種去耦合方式的實驗目的只是做定性上的判斷，所以若頻譜的訊號有嚴重的重疊的話，則不一定要將 o2 位置上的訊號完全去耦合，只要在判斷上不會產生誤判即可。

§11 1D NOE 減差實驗 (1D NOE Difference Experiment)

前言： 如果我們想知道任意兩氫原子核在空間上是否鄰近時 (一般的認定是 5 Å 以內)，則此時可以預先在一維頻譜上選擇性地只針對某一頻率位置的訊號予以干擾並觀察其與未被干擾時頻譜的差異。由於偶極作用的影響，只有與被干擾訊號在空間上鄰近的頻率位置的訊號面積會有所改變。藉由訊號面積的變化，NMR 頻譜學家定義 $\eta = (I - I_0)/I_0$ [此處 I_0 代表 NOE 效應為零時該訊號的面積；I 代表 NOE 效應存在時的訊號面積]。此一維 NOE 減差實驗 (1D NOE difference experiment) 的目的就是利用 NOE 效應，比較原始頻譜與被干擾過的頻譜之間的訊號面積的變化，而於一維頻譜上判斷兩頻率位置的訊號是否在空間上鄰近的證據 (一般而言 η 應不小於 5% 以確定此訊號面積的差異不是由於實驗誤差所造成)。由於 NOE 效應與距離的 6 次方成反比，所以可間接計算兩原子核間的距離。它的優點是解析度與靈敏度比二維頻譜的 NOESY 實驗來得高，但是缺點是實驗十分的敏感而不易做定量上的確認。

在此所介紹的一維 NOE 減差實驗僅限於作為定性上原子核是否接近的證據而不適用於定量上的研究。它的脈衝程序 **zgf2pr** 如下圖所示：



欲取得及畫出一維 NOE 減差實驗頻譜，依序可分成下列四大步驟：

(i) 建立一個適當的一維原始氫譜 (以下簡稱為*原始氫譜*)；

(ii) 執行由 **zgf2pr** 脈衝程式將要研究的原子核訊號予以飽和的 1D NOE 實驗頻譜 1

(以下簡稱為*實驗組氫譜*)；

(iii) 執行由 **zgf2pr** 脈衝程式加上 “blanking” 脈衝所得的 1D NOE 對照頻譜 (以下簡稱為*對照組氫譜*)；

(iv) 由 (*實驗組氫譜*) – (*對照組氫譜*) 得到 1D NOE 的減差頻譜。

(i) 建立原始氫譜：

(1) 以 *edc* 指令來建立一個名為 /1dNOE/1/1 的檔案目錄並鍵入 *rpar* H_probe all 來取用一組適用於一維氫譜實驗的參數。

(2) 以 *edasp* 指令來設定 NUC1 及 NUC2 皆為 1H。

(3) 執行完 *ii* → *rga* → *zg* → *efp* → *apk* → *abs* 後，移動游標至欲飽和的原子核頻率位置上並一一記下其化學位移值作為 o2 值之用 (以 Hz 為單位)。

(ii) 建立實驗組氫譜：

(1) 以 *edc* 指令來建立一個名為 /1dNOE/2/1 的檔案目錄。

(2) 鍵入 *eda* 指令並設定 PULPROG 內的脈衝程式名稱為 **zgf2pr**。

(3) 鍵入 *eda* 指令並設定 o2 的頻率為由步驟 (i-3) 所得到的值。

在 **zgf2pr** 脈衝程式中有三個參數要進行最佳化 (optimize)：o2、pl14、及 d1 值。我們的做法是依序對 o2 → pl14 → d1 參數值做最佳化。

(4) 在先設定 pl14 = 60 dB、及 d1 = 1 sec 之下，執行一系列的 o2 值並觀察其結果 (可以用 *paropt* 或是 *gs* 的方式執行)。在此記錄下最佳的 o2 值。

(5) 在取用最佳的 o2 值以及 d1 = 1 sec 之下，逐漸降低 pl14 之值並觀察實驗結果。由於 pre-saturation 的能量是由 pl14 之 power level 與 d1 的 pulse width 所決定，所以在某個 pl14 值之下能夠使該 o2 訊號位置的積分絕對值最小而且整個頻譜的訊號與基線相位未被扭曲時表示該 pl14 值是最佳的。

(6) 在取用最佳的 o2 值以及 pl14 值之下，逐漸 增/減 d1 之值並觀察實驗結果。d1 最佳值的判定與上述 pl14 值的判定相同。

(7) 取用分別由步驟 (4)、(5)、(6) 所得的 o2、pl14、及d1 值後，適度地增加 ns 值並鍵入 *zg* 指令以執行實驗。

(iii) 建立對照組氫譜：

先以 *edc* 指令來建立一個名為 /1dNOE/3/1 的檔案目錄。此時除了將 o2 值設定在一個完全與其他訊號隔離的頻率位置上 (譬如說，當 o2 < o1 時將之設在 －2 ppm；當 o2 > o1 時將之設在 15 ppm) 之外，取用與實驗組氫譜完全相同的取樣參數來執行實驗以得到對照組氫譜。

(iv) 建立減差頻譜：

(1) 鍵入 *re* 2 以進入實驗組氫譜。

(2) 鍵入 *edc2* 指令並於 "2nd data set" 欄中輸入對照組氫譜的檔案目錄。

(3) 單響左方面板的 dual icon (或是鍵入 *dual* 指令) 並單響左方面板的 diff icon ⇒ 此時會得到減差頻譜。再單響左下方面板的 return icon → 回答 Save & return → 回答 OK ⇒ 此時在 /1dNOE/2/2 檔案目錄將儲存減差頻譜的資訊。

特別注意：1D NOE 實驗是非常敏感的實驗，對於下列數項的要求十分地高：

1. 氘-鎖定：勻場完成後將 lock power 先調高至飽和之後再下降 3 dB 左右。
2. 系統最好要恆溫。
3. 關閉 spin 之下做實驗。
4. 對勻場的要求特別高。
5. 實驗組氫譜與對照組氫譜相減後得到的 1D NOE 減差頻譜的 NOE 效果是觀察該訊號位置上的面積積分值。
6. 作者建議下列步驟以儘量減少由於任何干擾實驗的因素：
   假設實驗組氫譜與對照組氫譜的掃瞄次數為 16 次，我們將它們各分成 4 個掃瞄次數為 4 次的實驗並交替地 (alternatively) 執行之。做法是鍵入 *edmac 1dNOE* 以編輯一個名稱為 *1dNOE* 的巨集指令。之後再鍵入 *1dNOE* 以執行之。此 *1dNOE* 的內容為：

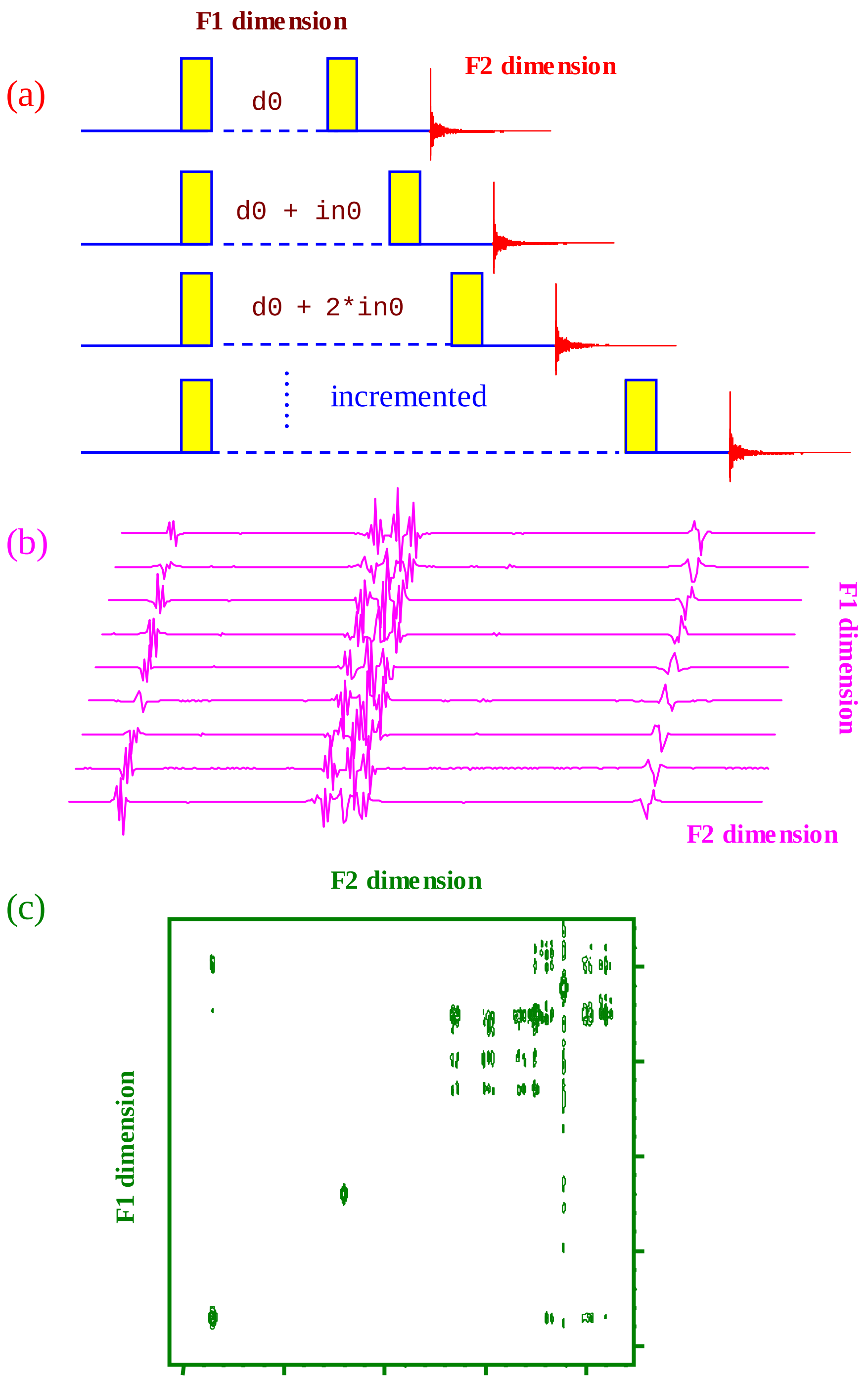
```
re 2
ns 4
zg
re 3
ns 4
zg
re 3
ns 4
go
re 2
ns 4
go
re 2
ns 4
go
re 3
ns 4
go
re 3
ns 4
go
re 2
ns 4
go
```

7. 由於 Bloch-Siegert effect 會造成訊號位置的少許偏移，為避免在執行 “減差” 時的不對齊，當 O2 > O1 時請將對照組的 O2 值置於沒有訊號的 downfield 位置 (譬如說 14 ppm)；當 O2 < O1 時請將對照組的 O2 值置於沒有訊號的 highfield 位置 (譬如說 –2 ppm)。

第III部分：常用二維頻譜實驗的操作說明

在正式進入二維頻譜實驗操作之前，作者依個人經驗先將幾個影響二維頻譜實驗比較重要的觀念在 §12、§13與 §14 予以澄清，以利高品質二維頻譜的取得。

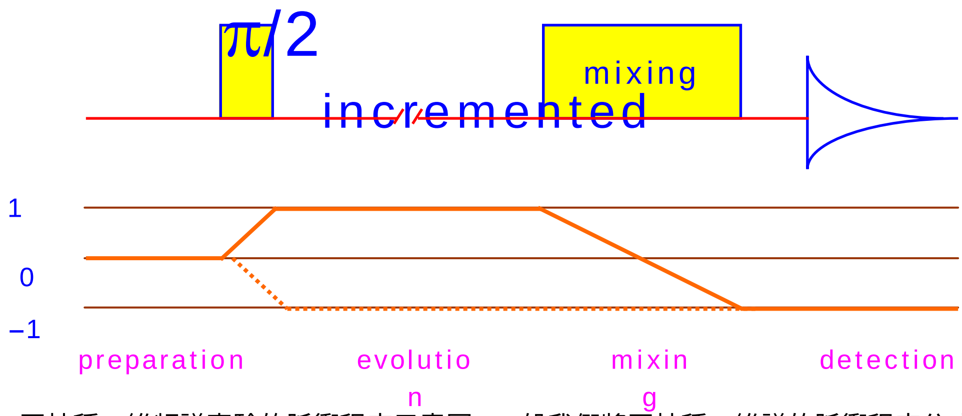
§12 二維頻譜的基本概念



圖四十一： 二維頻譜的形成示意圖。(a) 實驗上我們執行一系列的 “incremented” 一維實驗來 “組合” 出二維頻譜；(b) 經過 F2 維度的 Fourier 轉換後使得每一個 F2 維度上的 incremented 實驗成為 frequency-domain；(c) 再經過 F1 維度的 Fourier 轉換後獲得 F2 與 F1 維度上皆為 frequency-domain 的二維頻譜。

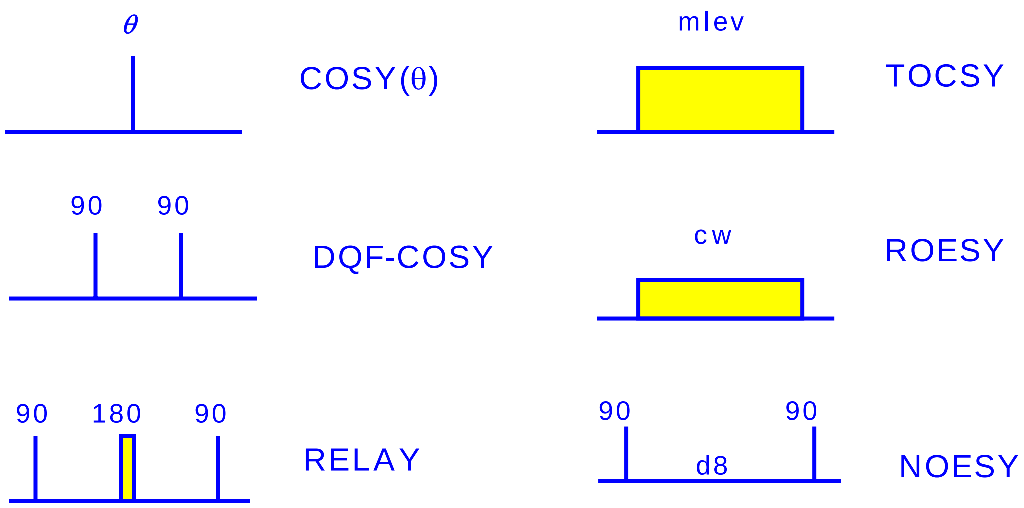
顧名思義，二維頻譜有兩個維度 (方向)，一個稱之為 F2 維度，另一個稱之為 F1 維度。F2 維度在二維頻譜中被定義成收集訊號 (FID) 的觀測頻道 (observe channel)，所以說基本上它類似於平常的一維頻譜，只不過其差異在於 F2 維度為了整體二維實驗時間上的考量而比一維頻譜採用了較少的取樣點，因此其 FID 常常有被截斷 (truncated) 的情形發生。F1 維度是一個 "間接" (indirect) 的維度，大致上它是依照所設定的原子核種類、載頻頻率 (F1 維度的中心值 O2)、頻寬 (SW1)、組成 F1 維度的數據點 (TD1) … 予以定義。圖四十一是二維頻譜的形成示意圖。在完成一系列的一維頻譜實驗 (其間的差異僅在於不同的 incremented 值而已) 後我們得到一系列的 FID 結果 (圖 a)；之後我們依序先將之在 F2 維度上予以執行 Fourier 轉換以得到一系列的一維頻譜 (圖 b)；再於 F1 維度上執行 Fourier 轉換以便將 F1 維度上的振盪訊號轉換成頻率方面的資訊 (圖 c)。如果 F1 維度與 F2 維度皆代表相同的原子核種的話，此時我們稱此二維頻譜實驗為同核種二維譜實驗；當 F1 維度與 F2 維度代表不同的核種時，我們稱此二維頻譜實驗為異核種二維譜實驗。此外，當異核種二維頻譜實驗中所測量的原子核是氫原子核時，就稱此實驗為反式 (inverse) 實驗；如果測量的原子核是非氫的原子核時 (有時候以 X 代表此原子核)，就稱此實驗為標準 (normal) 實驗。

為了便於二維頻譜的分析，通常我們把一個二維頻譜的脈衝程序分解成四大部分：準備期 (preparation period)、演化期 (evolution period)、混合期 (mixing period)、以及測量期 (detection period)。圖四十二是一個同核種二維頻譜的脈衝程序示意圖。此時在準備期間我們將磁矩由 Z 軸激發至 Y 軸上；於所謂的演化期間 (evolution period)，依照不同旋進速率的訊號在演化期間有不同程度的演化角度 ($\theta_i = \omega_i t$) 的概念得到不同原子核的 shift-labelled 及 spin-editting 資訊以確定該訊號在 F1 維度中的化學位移位置；互相有交互作用 (也許是 through-bond J-coupling 或是 through-space dipolar interaction) 的原子核於混合期間會傳遞彼此的化學位移資訊及磁矩強度，因此在二維頻譜中會於 F2 與 F1 的化學位移交會處出現所謂的交叉訊號 (cross-peak)；測量期部分就好比一維頻譜實驗的測量，但是它會在每一次不同的 incremented 值都執行取樣的工作，因此最後會獲得一系列的 FID 訊號。



圖四十二： 同核種二維頻譜實驗的脈衝程序示意圖。一般我們將同核種二維譜的脈衝程序分成四個部分。preparation 期間作為自旋系統的前處理；藉由所謂的 evolution 期間不同頻率的訊號有不同的旋進角度 (precessing angle) 值，因此我們可以區分它們；經過 F1 維度的 Fourier 轉換後，不同頻率的訊號就會出現在不同的化學位移位置上；mixing 期間可依需要設計成適用於 through-bond 或是 through-space 的實驗；在同核種二維譜實驗中，detection 期間通常不使用去耦合的技術。

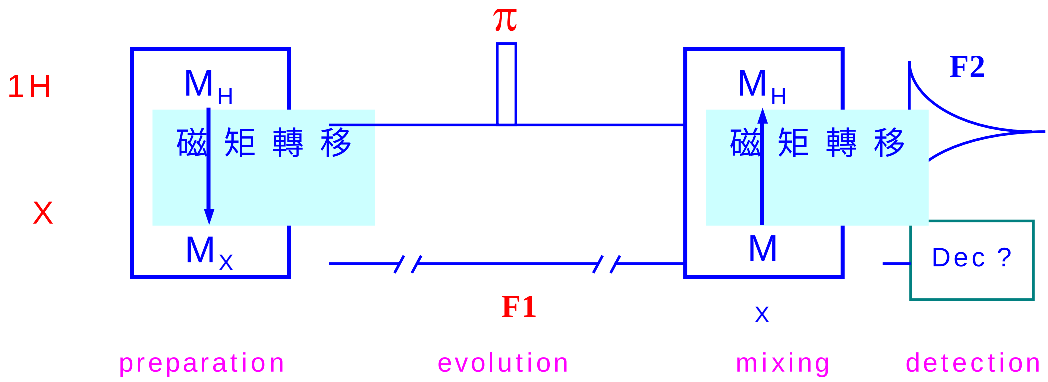
依照混合期的型式，我們可以將常用的同核種二維譜實驗予以圖示如圖四十三：



圖四十三：同核種二維譜實驗依圖四十二混合期之分類圖示。

圖四十四則是一個異核種二維頻譜的脈衝程序示意圖。由於一般二維頻譜實驗的靈敏度與解析度皆比一維頻譜實驗來得差，為了提昇訊號的靈敏度起見，現代的異核二維譜實驗皆是測量靈敏度較高的氫原子核 (也就是以反式實驗為主，請參考第 44 頁表5)。基於反式實驗在訊號靈敏度上的優勢，本使用手冊所介紹的異核種二維頻譜脈衝實驗

皆以反式實驗的脈衝程序作為範例。



圖四十四：異核種二維頻譜的脈衝程序示意圖。

與同核種二維頻譜的脈衝程序相比較，異核種二維頻譜在準備期間會藉由 J-耦合作用先將磁矩由氫原子核轉移至靈敏度較低的 X 原子核 (此處 X 原子核代表所有不屬於氫核且 $J_{HX} \neq 0$的原子核)。因此，在演化期間我們所獲得的是 X 原子核的化學位移與 $^{n}J_{HX}$ 作用的資訊 (此處 $^{n}J_{HX}$ 代表氫原子核與 X 原子核之間透過 n 個化學鍵所傳遞的 J-耦合作用)。由於 F1 維度的 Fourier 轉換是作用於演化期間而F2 維度的 Fourier 轉換是作用於測量期間，所以經過 Fourier 轉換後在 F2 維度所獲得的是屬於氫維度方面的資訊，而 F1 維度所獲得的是屬於 X 維度方面的資訊，因此造成了異核種二維頻譜。與同核種二維頻譜相同的是，測量期間好比一維頻譜實驗的測量，並在每一次演化期間的不同 incremented 值都執行取樣的工作，因此最後會獲得一系列的 FID 訊號。

§13 t_1 noise 綜觀

t_1 noise 指的是在二維頻譜中當有強大的訊號 (譬如說稀薄溶液中的溶劑訊號) 存在時，於此強大訊號的兩側且在平行於 F1 維度的方向上所出現的帶狀振盪。t_1 noise 屬於一種 "偽造的" 基線扭曲或基線振盪訊號，但究其成因它仍具有某些規律性的存在。所以 t_1 noise 仍可能運用實驗技巧將之抵消或是降低，而且它應該與電子在收訊線圈 (receiver coil) 或是在放大器 (amplifier) 中的紊亂熱運動 (亦即 "真正的" 雜訊，或是稱之為 Johnson's noise) 有所區分。產生 t_1 noise 的原因有可能是由於實驗環境的變化、硬體上的 不穩定/不完美 或是軟體上的 設計/處理 不當、甚至於是人為上的疏失。至於 t_1 noise 的影響所及則如前面所述, 會使強大訊號的兩側有邊帶 (sideband) 的產生而造成頻譜判讀上的困擾。一般而言，t_1 noise 對一維譜的影響較小，通常可以忽略不計而不至於影響頻譜的外觀。下表七描述 t_1 noise 產生的因素及其相對應的解決方式。

可能原因	解決方式
F1 ridge：由於在強大的 NMR 訊號上，t_1 histogram 的第一個取樣點有異常大的訊號強度。這多半肇因於一個 d.c. 訊號的存在。	於執行正式收訊之前執行一些 dummy scans。
不適合的訊號點取樣：一組類比訊號在經數位化轉換而成為一系列的柱狀形的訊號時，取樣時應以該類比訊號的中央值為準而不是取某一邊界值。像早期的 DANTE 序列就犯有此錯誤。	執行基線修正以消除此基線偏差值。
因溶劑氘訊號的靈敏度不足時所造成的 Field/frequency regulation 不穩定：這在一維頻譜中會造成譜線寬化以及雜訊號振盪；而在二維頻譜中就產生了 t_1 noise。	使用 digital lock、改採用較濃的氘溶劑、做更佳的勻場動作以及使用較強的 lock power/gain 值。
因樣品旋轉：樣品旋轉時使得每一個 t_1 histogram 的起始條件不一定相同。	做二維頻譜實驗時停止樣品的旋轉
因 B_1 spatial inhomogeneity 或溫度梯度造成同一 isochromat 內的不同分子在不同實驗時間下可能具有不同的 Larmor 旋進頻率，造成訊號在頻率位置、強度、以及訊號頻寬的變異。	於實驗前執行較佳的勻場以及於實驗進行中使用恆溫系統以穩定實驗時的溫度。
Receiver gain instability、receiver phase shifting、脈衝程序的設計不良、 evolution time 過長、磁碟的轉換時間過長時，則因這些儀器的不穩定而在二維頻譜中就會產生 t_1 noise。	選用匹配、相容、穩定性高的硬體配備以及使用適當的脈衝程式。最佳的方式是使用具磁場梯度的脈衝程式。

表七： t_1 noise 產生的因素及抵消其效應的解決方式

§14 二維頻譜訊號處理參數說明

所有 NMR 實驗所得到的原始資訊皆是隨時間而衰退的時域訊號 FID。如何將它們轉換成使用者易於分析的頻譜資訊就有賴於數據處理參數的設定藝術了。如同在第 23 頁的步驟四針對一維頻譜的訊號處理一樣，在此我們針對二維譜的特性來一一對零填滿 (zero filling)、視窗函數、相位校正、化學位移、線性預測、及其他注意事項 (miscellaneous) 做說明。

零填滿 (Zero filling)

基於時間上的考量，二維譜實驗在氫譜的方面只取用約一維氫譜實驗的 1/8 ~ 1/16 左右的數據點；而在 X 原子核的方面只取用在一維頻譜實驗的 1/128 ~ 1/256 左右的數據點。在此 FID 被嚴重 truncated 的情況下，我們除了要同時取用 real 及 imaginary 方面的資訊以外，還可以於 FID 的尾部加諸一些強度為零的資料點 (也就是說 zero filling) 以得到更佳的頻譜解析度。當設定 si = td 時，訊雜比可為 si = 0.5 * td 時的 1.4 倍左右 (這是因為雖然訊號大小不改變但雜訊的強度變小了)。更多 (也就是說 si > td) 的零填滿則是使訊號更 "平滑些" 而已 (參考圖二十三)，並未使頻譜解析度增加。在同核種二維譜實驗中，為使訊號看起來更對稱而易於分析，常常於 F2 與 F1 維度上使用相近的 si 數值。在異核二維譜實驗中，碳核維度的方面通常都使用 si = 2 * td 的做法使碳譜維度的訊號解析度看起來好些，而氫核維度上維持 si = td 的做法。

視窗函數的應用 (Window/Weighting function)

一維頻譜實驗可能對靈敏度與解析度的要求很高，但二維頻譜實驗的目的主要是在於分子結構的辨識 (assignment)，以確認 H-H 之間的 J-耦合 (COSY)、H-H 之間偶極矩作用 (NOESY)、C-H 之間的直接 $^{1}J_{CH}$-耦合 (HSQC、HMQC)、C-H 之間的間接 $^{2,3}J_{CH}$-耦合 (HMBC)。一維譜中常用的 譜線寬化 (line broadening，lb) 技術會使得判定欲分析的兩個原子核訊號，譬如說 (δ_C，δ_H)，之間是否有交互作用更為困難。基於結構辨識上的需要，二維頻譜實驗所使用的視窗函數多為 shifted sine bell (SINE) 函數或是 shifted squared-sine bell (QSINE) 函數的型式。如此會極度的強調正中央的訊號點而忽略其兩翼的訊號點。至於使用的是 sine 函數或是 cosine 函數則是由 ssb 參數值所決定。0 ≤ ssb

< 2 代表 sine 函數；ssb = 2 代表 cosine 函數；ssb > 2 代表 shifted-sine 函數 (譬如說當 ssb = 3 時代表約 70° shifted 的 sine 函數)。我們必需視實驗所得的 FID 特性來定義 ssb 值。附帶一提的是，除了在極稀薄的樣品時我們在碳的維度 (F1) 上使用 128 次的 increments 外，一般 increments 之值都不小於 256 次。

相位校正 (Phase correction)

其實二維頻譜的相位校正與一維頻譜的相位校正概念幾乎大同小異，只是在資料點的儲存以及數學處理的考量上我們習慣上是先對 F2 維度再對 F1 維度做相位校正。一般調整二維頻譜相位的原則是使其 negative 部分的訊號儘量減少而 positive 的部分儘量 in-phase (小分子 NOESY 實驗則是使其 negative 部分的訊號儘量 in-phase 而 diagonal 訊號儘量減少)。

值得注意的是，COSY 與 HMBC 的計算結果顯示其交叉訊號 (cross peaks) 的數學為 $\sin(\pi J t_1) * \sin(\pi J t_2)$ 的anti-doublet 型式，因此於其相位模式中採用絕對值的方式來顯示結果以避免訊號有被寬化或是扭曲的情形發生。

化學位移 (Chemical shift)

二維頻譜的化學位移校正與一維頻譜的化學位移校正也是大同小異，只不過在二維頻譜有兩個維度要執行化學位移校正。由於二維頻譜的 F2 維度與 F1 維度會分別對應到一維頻譜，所以我們可以先取出對應的一維頻譜並記錄下其 sr 值，再將此 sr 值於 *edp* 的參數設定中將其值輸入至二維頻譜上即可確定此一維與二維頻譜的化學位移值完全匹配。如果已確知二維頻譜中的某一個訊號的化學位移值，則可於放大該區間後單響面板左方的 calibrate icon，之後再以滑鼠中鍵單響要做化學位移校正的訊號點再輸入其 F2 及 F1 維度上的化學位移數值即可。

線性預測 (Linear Prediction，LP)

在第 25 頁我們已約略描述了的線性預測部分。在二維頻譜中由於 FID 被 truncated 的情形更嚴重 (尤其是在 F1 維度上)，所以使用線性預測是非常必要的。視吾人在 F1 維

度上取樣的型態，我們在 F1 維度上的線性預測有可能是 real (像是以 QSEQ、TPPI 作為 F1 維度上的取樣) 或是 complex (像是以 QF、STATES、STATES-TPPI、Echo/Anti-Echo 作為 F1 維度上的取樣)。在數學的原理上，線性預測類似一般的 Taylor's formula (泰勒展式), 依據不同組合的基礎頻率及其相對應的係數來將之與實驗所得的 FID 予以比較來推測該 FID 在未受 truncated 時應有的原始 FID。線性預測的優劣與使用係數的個數 (NCOEF) 與預測的點數 (LPBIN – TDeff) 有關，應該視頻譜的特性來予以最佳化 (optimized)。

其他注意事項 (Miscellaneous)

(i) 二維頻譜由於靈敏度、解析度及相位的扭曲，絕大部分情況下不處理積分的問題。

(ii) 同核種二維譜可利用對稱性的特性來除去 t_1 noise 的干擾 (使用 *sym* 指令)。

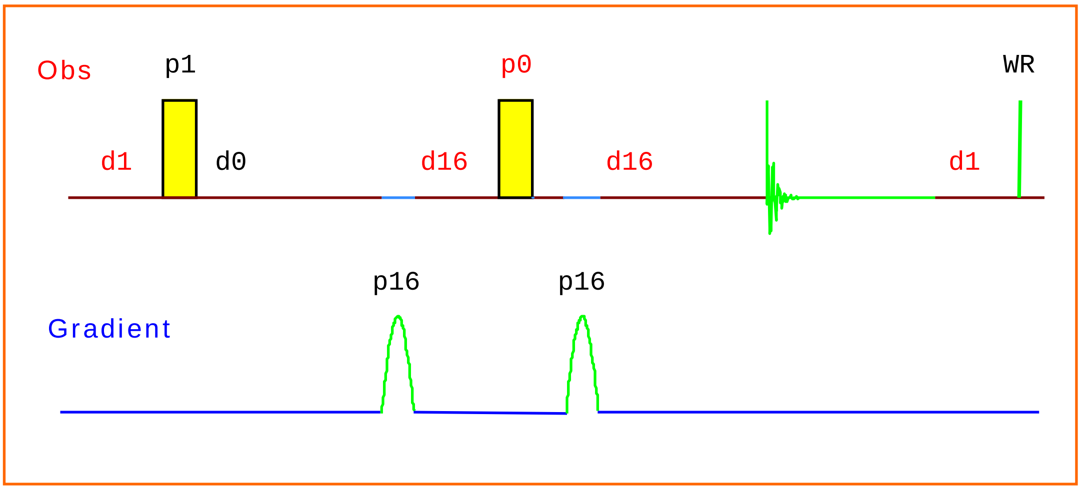
(iii) 一般在溶劑訊號較大的情形, 可於訊號處理時使用 deconvolution 的技巧對頻譜基線做處理以除去溶劑的訊號及改善二維頻譜的外觀。其做法是於 *edp* 指令中設定 BC_mod = qpol 或是 qfil。使用方面請與作者聯繫。

(iv) 最大熵方法 (Maximum Entropy Method，MEM) 可同時增加訊號的靈敏度與頻譜的解析度。Powerful and dangerous，有興趣的讀者請與作者聯繫。

(v) 對於 t_1 noise 的去除另有 "skyline projection" 與 "convolution projection" 兩種方式，使用方面請與作者聯繫。

§15 COSY 實驗操作指引

前言： COSY 是 COrrelation SpectroscopY 的簡寫，是屬於同核種的二維氫譜實驗。藉由其交叉訊號 (cross peak) 可以得知經由化學鍵傳遞的氫原子核之間的 $^{3}J_{HH}$ 耦合作用，以期推測分子結構。其脈衝程序 **cosygp** 如下圖所示：



欲取得及畫出一個 COSY 二維頻譜，依序可分成下列四個步驟：

(i) 建立一個一維氫譜以取得適用的 sw、o1及 sr 值；

(ii) 依據該一維氫譜來設定 COSY 實驗所需的參數值；

(iii) 依據 COSY 實驗特性予以做適當的數據點處理 (data processing)；

(iv) 畫出 COSY 頻譜。

(i) 建立一個一維氫譜的步驟：

1. 鍵入 *edc* 指令並為此次實驗設定其檔案目錄為 /COSY-1D/1/1。
2. 鍵入 *rpar* 指令並選擇 H_probe 用以載入一組適合執行一維氫譜的參數。
3. 鍵入 *wobb* 指令並對探頭做 tune 及 match 的動作。
4. 選 Window menu → BSMS display → 單響 Shim → 單響 Spin on 以旋轉樣品。
5. 鍵入 *lock* 指令，此時系統會自動做磁場鎖定的工作。
6. 對樣品做勻場 (shimming) 的動作。
7. 依序鍵入 *ii* → *rga* → *zg* 指令來執行收集訊號的動作。

8. 依序鍵入 *efp* → *apk* → *abs* 指令來執行快速 Fourier 轉換、自動相位校正及基線校正的動作。
9. 調整一維氫譜的左右邊界至所有訊號都可看到的範圍即可，並且依序單響 dp1 及 sw-sfo1 來確認此新設定的 sw 及 o1 值。此一維氫譜的 sw 與 o1 值將用於 COSY 實驗的取樣設定。
10. 鍵入 *eda* 指令並調整 td 值使得 AQ 收訊時間為 FID 時間的 4/3 倍左右。
11. 之後再依序鍵入 *zg* → *efp* → *apk* → *abs* 來取得該一維氫譜作為下面二維 COSY 實驗的 1D projection 之用。

注意： 雖然樣品的 90° 脈衝時間 (p1 值) 在大部分的情況下約略為一固定值，但是在水溶液樣品及樣品濃度極大時其 90° 脈衝時間會有所不同 (從 wobble curve 的 match 吸收情形可約略看出)。為了慎重起見，我們建議在時間允許之下以 *paropt* 指令重新來找尋適用於該樣品的 90° 脈衝時間。

(ii) 依據該一維氫譜的 o1 與 sw 值來設定 COSY 實驗：

1. 停止對樣品旋轉並重新做勻場的動作 (做任何 2D 實驗時皆不旋轉樣品！)。
2. 鍵入 *edc* 指令來建立一個檔案目錄為 /COSY-2D/1/1。
3. 鍵入 *rpar* 指令並選擇 COSY_probe 用以載入一組適合執行 COSY 的參數。
4. 再度鍵入 *eda* 指令，並檢查其內是否符合下方 “表1” 的實驗收訊參數設定。
5. 依序鍵入 *ii* → *rga* → 將由 *rga* 所得之 rg 值除以 2 ~ 4 → *zg* 以執行 COSY實驗。(我們也可以定 d0 為一個很大的值，再鍵入 *rga* 來得到適當的 rg 值)。

(iii) 依據 COSY 實驗特性予以做適當的數據處理 (data processing)：

1. 鍵入 *edp* 指令，並檢查其內是否符合下方 “表2” 的數據處理參數設定。
2. 鍵入 *xfb* 指令以進行 F1 及 F2 維度的快速 Fourier 轉換。
3. 依序鍵入 *abs2* → *abs1* → *sym* 指令來執行訊號基線修正的動作。
4. 調整欲畫出頻譜的左右邊界值及輪廓圖的階層數 (levels) 的作法：

   單響左方面板的 limits 並回答下面問題：

(a) 輸入欲畫出之頻譜的 F1、F2 左右邊界值 (此相當於一維頻譜的 dp1)；

(b) 輸入欲畫出之輪廓圖的階層數值；

(c) 回答 “y” 以顯示輪廓圖 (contour plot)。

如此螢幕會顯示出被設定的範圍。

附註：

(1) 由於 COSY 頻譜採用絕對值模式，所以不執行相位校正的動作。

(2) 在水溶液樣品中，請改用含 double-quantum COSY (DQ-COSY)、WATERGATE 或是 water-presaturation 的 COSY 脈衝程序。

(iv) 畫出頻譜：

(1) 鍵入 *edg* 指令並修改下列繪圖參數：

單響 EDPROJ1 的 ed 並鍵入如下所述後單響 save 以儲存此參數設定

```
PF1DU      u
PF1USER    guest
PF1NAME    COSY-1D
PF1EXP     1
PF1PROC    1
```

單響 EDPROJ2 的 ed 並鍵入如下所述後單響 save 以儲存此參數設定

```
PF2DU      u
PF2USER    guest
PF2NAME    COSY-1D
PF2EXP     1
PF2PROC    1
```

(2) 單響 save 以跳出 edg 模式。

(3) 鍵入 setti 指令並修改標題 (title) 的內容。

(4) 鍵入 view 指令以觀察欲列印出的頻譜。

(5) 鍵入 plot 指令來畫出頻譜。

COSY 表1： COSY 實驗的收訊參數 (acquisition parameters)

F2 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
PULPROG	cosygp	使用具 Z-gradient 梯度磁場的 COSY 脈衝程式
TD	2k	組成 F2 維度上 FID 的點數
NS		實驗次數必需為 1 的整數倍以完成相位循環
DS	16	dummy scan 的次數
D0	3 usec	用於 F1 頻道的 t_1 遞增值
D1	1.5 sec	弛豫用的時間；應設為約 T_1 時間的 1.25 倍左右
D13	3u	
D16	200 usec	梯度磁場恢復時間，可設為 50 ~ 450 usec
SW	F2 維度的頻譜寬度 (取用 /COSY-1D/1/1所得之值)	
O1	F2 維度的基準值 (取用 /COSY-1D/1/1 所得之值)	
PL1		氫譜的高強度脈衝值
GP1	SINE.100	第一個脈衝磁場梯度的檔案名稱
GP2	SINE.100	第二個脈衝磁場梯度的檔案名稱
GPZ1	10	第一個脈衝磁場梯度的 Z 方向強度的百分比
GPZ2	10	第二個脈衝磁場梯度的 Z 方向強度的百分比
P0	氫譜的 45° 脈衝時間，COSY45 中定 P0 = 0.5*P1	
P1		氫譜的 90° 脈衝時間
P16	1 msec	脈衝磁場梯度作用時間
F1 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
TD	256	F1 維度的實驗次數
ND0	1	每次循環的 d0 數目
IN0	1/SW = 2*DW	t_1 遞增值；應為 F2 維度上 DW 值的 2 倍
SW		F1 維度的頻譜寬度 (與上方 F2 維度完全相同!)
O1		F1 維度的基準值 (與上方 F2 維度完全相同!)

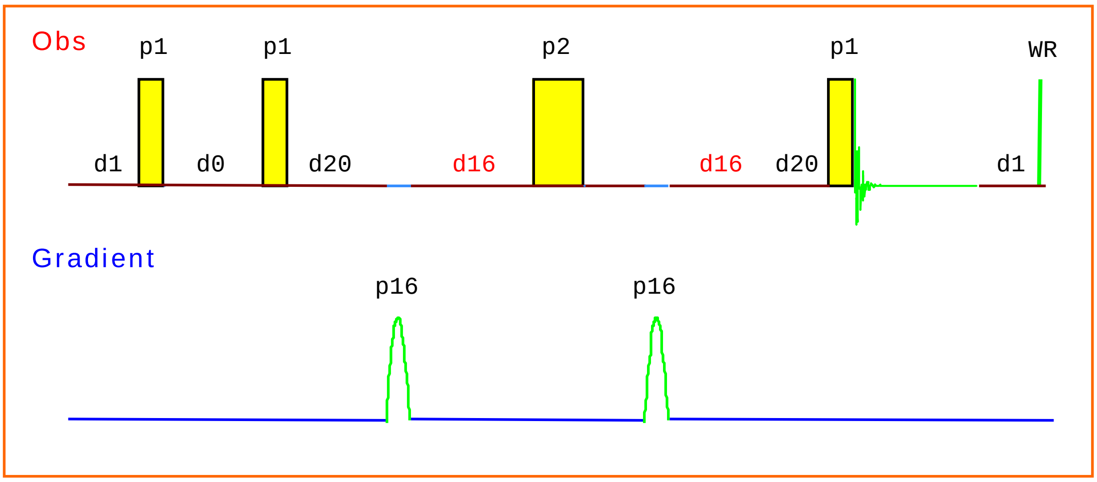
COSY 表2： COSY 實驗的數據處理參數 (data processing parameters)

F2 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
SI	512	組成 F2 維度上頻率空間的點數
WDW	SINE	將 F2 維度上的數據點乘上 phase-shifted sine 函數
SSB	0	定此sine 函數為 pure sine 函數
PH_mod	no	不做進一步的處理
PKNL	TRUE	進行 phase error 的修正
SR		取用 /COSY-1D/1/1所得之 SR 值
BC_mod	quad	將所有 FIDs 皆減少一個常數值以進行基線的修正
F1 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
SI	512	F1 維度的快速 Fourier 轉換點數
WDW	SINE	將 F1 維度上的數據點乘上 phase-shifted sine 函數
SSB	0	定此sine 函數為 pure sine 函數
PH_mod	mc	定此維度是一個絕對值的頻譜 (magnitude spectrum)
BC_mod	no	不對 F1 維度進行基線的修正
SR		取用 /COSY-1D/1/1所得之 SR 值
MC2	QF	執行 forward quadrature complex快速 Fourier轉換

註：若您的探頭不具備磁場梯度的話，則實驗參數請參考 user's guide 的 Table 39、40。

§16 NOESY 實驗操作指引

前言： NOESY 是 Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY 的簡寫，它屬於一種同核的二維氫譜實驗。NOE 效應指的是當兩原子核之間的空間距離十分鄰近時，如果此時將其中一個原子核予以干擾時則與之在空間上鄰近的原子核會因為彼此之間的偶極作用而改變其訊號面積。雖然在流動性大的液體樣品中偶極作用會因為各向均性而沒有造成訊號頻寬寬化的現象，但是偶極作用仍會產生能量上的交換而造成訊號強度的改變。一般而言，原子核間距離在 2.5 Å 以內的稱之為強作用；原子核間距離在 3.5 Å 以內的稱之為中作用；原子核間距離在 5 Å 左右的稱之為弱作用。依照理論計算，分子量較大的生化分子其 NOESY 頻譜的交叉訊號與對角線上的訊號具有相同的正負號；而分子量較小的一般有機分子其 NOESY 頻譜的交叉訊號與對角線上的訊號具有相反的正負號。此外，混合時間 (mixing time) d8 的選定亦影響 NOESY 頻譜的品質甚鉅。對於生化分子，一般我們設定其混合時間 d8 在 80 ~ 200 msec；對於有機分子，一般我們設定其混合時間在 400 ~ 800 msec。NOESY 實驗的脈衝程序 **noesygptp** 如下圖所示：



欲取得一個 NOESY 頻譜，可分成下列四個步驟：

(i) 建立一個一維氫譜以取得適用的 sw、o1及 sr 值；

(ii) 依據該一維氫譜來設定 NOESY 實驗所需的參數值；

(iii) 依據 NOESY 實驗特性予以做適當的數據點處理 (data processing)；

(iv) 畫出頻譜。

(i) 建立一個一維氫譜的步驟：

1. 鍵入 *edc* 指令並為此次實驗設定其檔案目錄為 /NOESY-1D/1/1。
2. 鍵入 *rpar* 指令並選擇 H_probe 用以載入一組適合執行一維氫譜的參數。
3. 鍵入 *wobb* 指令並對探頭做 tune 及 match 的動作。
4. 選 Window menu → BSMS display → 單響 [Shim] → 單響 [Spin on] 以旋轉樣品。
5. 鍵入 *lock* 指令，此時系統會自動做磁場鎖定的工作。
6. 對樣品做勻場 (shimming) 的動作。
7. 依序鍵入 *ii* → *rga* → *zg* 指令來執行收集訊號的動作。
8. 依序鍵入 *efp* → *apk* → *abs* 指令來執行快速 Fourier 轉換、自動相位校正及基線校正的動作。
9. 調整一維氫譜的左右邊界至所有訊號都可看到的範圍即可，並且依序單響 [dp1] 及 [sw-sfo1] 來確認之。此一維氫譜的 sw 與 o1 值將用於 NOESY 實驗的設定。
10. 鍵入 *eda* 指令並調整 td 值使得 AQ 收訊時間為 FID 時間的 4/3 倍左右。
11. 之後再依序鍵入 *zg* → *efp* → *apk* → *abs* 來取得所需之一維氫譜。

注意： 雖然樣品的 90° 脈衝時間 (p1 值) 在大部分的情況下約略為一固定值，但是在水溶液樣品及樣品濃度極大時其 90° 脈衝時間會有所不同 (從 wobble curve 的 match 吸收情形可約略看出)。為了慎重起見，我們建議在時間允許之下以 *paropt* 指令重新來找尋適用於該樣品的 90° 脈衝時間。

(ii) 依據該一維頻譜來設定 NOESY 實驗：

1. 停止對樣品的旋轉並重新做勻場的動作 (做 2D 實驗時不旋轉樣品!)。
2. 鍵入 *edc* 指令來建立一個檔案目錄為 /NOESY-2D/1/1。
3. 鍵入 *rpar* 指令並選擇 NOESY_probe 用以載入一組適合 NOESY 的參數。
4. 再度鍵入 *eda* 指令，並檢查其內是否符合 “表1” 的 NOESY 收訊參數設定。
5. 依序鍵入 *ii* → *rga* → *zg* 指令以執行 NOESY 實驗。

(iii) 依據 NOESY 實驗特性予以做適當的數據處理 (data processing)：

1. 鍵入 *edp* 指令，並檢查其內是否符合下方 "表2" 的數據處理參數設定。
2. 鍵入 *xfb* 指令以進行 F2 及 F1 維度的快速 Fourier 轉換。
3. 依序鍵入 *abs2* → *abs1* 指令分別對 F2 及 F1 維度執行基線修正的動作。
4. 調整二維頻譜的相位 [我們先調整 F2 維度 (也就是. row) 再調整 F1 維度 (也就是 col) 的相位]：
   - (a) 先單響左方面板的 phase icon 以進入相位校正的模式。
   - (b) 其次是以滑鼠左鍵單響 row。
   - (c) 移動游標至圖譜中最左下方的交叉訊號上，再單響滑鼠中鍵予以定義其為要執行相位校正的該 F2 維度圖譜。確定了之後就可以用滑鼠左鍵單響 mov 1 icon 將之載入至右上角的 "window 1" 上。(我們可以用滑鼠左鍵單響左方的 + - icon 來選擇上一個或是下一個 F2 維度的圖譜。)
   - (d) 重覆步驟 (c) 但此時取右上方的 F2 維度圖譜並移送到 "window 2" 上。
   - (e) 單響左方面板的 ph0 及 ph1 icon 並且以拖曳 (drag) 的方式來分別對零次項與一次項做相位校正使 "window 1" 與 "window 2" 上的訊號都能同相位 (對於小分子的 NOESY 實驗，有可能相位為 anti-phase)。
   - (f) 以滑鼠左鍵單響左下方面板的 return icon → 回答 save → 回答 OK 以完成 F2 維度的相位校正。
   - (g) 重覆步驟 (b) ~ (f)，但此時是對 F1 維度部分 (也就是 col) 做相位校正。
   - (h) 在 F2 與 F1 維度皆完成相位校正後，以滑鼠左鍵單響左下方面板的 return icon → 回答 return 以回到修正相位後的頻譜。
5. 調整欲畫出之左右邊界值及輪廓圖的階層數 (levels) 的作法：

   單響左方面板的 limits 並回答下面問題：
   - (i) 輸入欲畫出之頻譜的 F1、F2 左右邊界值 (此相當於一維頻譜的 dp1)；
   - (ii) 輸入欲畫出之輪廓圖的 level 值；
   - (iii) 回答 "y" 以顯示輪廓圖 (contour plot)。

   如此螢幕會顯示出被設定的範圍。

附註：

(1) 由於 NOESY 實驗為 phase-sensitive 型態的頻譜，所以必需同時顯示 positive 及 negative 訊號。

(2) 經適當相位校正後，對角線上的訊號應全為 positive 或 negative；而非對角線上的 cross peak 訊號可能與對角線上的訊號同相位 (大分子) 或是反相位 (小分子)。

(3) 可以再次執行 *abs2* → *abs1* → *sym* 於此同核種二維譜實驗中除去不對稱的訊號。

(4) 請注意 phc0與 phc1之值不可以大於 ±360°，否則可能發生滾動基線 (rolling base) 的現象。

(5) 以下再針對二維譜的相位校正做補充的說明 (於單響 phase icon 後)：

(i) 訊號強度的 放大/縮小：

以滑鼠左鍵單響 *2 *8 /2 /8 或是按住滑鼠左鍵不放之下以 “壓拖” (press-and-drag) 左方面板的 ⇕ 來調整訊號強度的放大倍率。

(ii) 局部放大某頻率區間的訊號：

移動游標至螢幕上後並單響滑鼠左鍵 ⇒ 此時游標形狀變成十字 → 移動游標至所欲放大頻率區間的左上方並第一次單響滑鼠中鍵以定義區間的左上方 → 移動游標至所欲放大頻率區間的右下方並第二次單響滑鼠中鍵以定義區間的右下方 → 單響滑鼠左鍵以完成區間的設定 → 以滑鼠左鍵單響 □ 將定義好的區間放大成全螢幕。

(iii) 單響 all icon 以顯示成全螢幕 ↔ 單響 exp icon 只顯示被定義示的區間。

(iv) 改變等高線間隔 (contour level) 的大小：

按住滑鼠左鍵不放並 “壓拖” (press-and-drag) 左方面板的 #color icon來調整等高線間隔的大小 (從右下角的顯示圖可觀察其變化)。

(v) 循序單響 +/– icon 以顯示正/負值的的訊號。

(vi) big: 1 2 3 是分別定義 window 1,2,3 視窗中最強的訊號作為相位校正的基準值。

cur: 1 2 3 是分別定義 window 1,2,3 視窗中自定的位置作為相位校正的基準值。

(vii) 單響左方的 + – icon 以 增/減 F2 或 F1 維度上的圖譜 incremented 編號。

(iv) 畫出頻譜：

(1) 鍵入 *edg* 指令並修改下列繪圖參數 ：

單響 EDPROJ1 的 [ed] 並鍵入如下所述後單響 [save] 以儲存此參數設定

PF1DU u

PF1USER guest

PF1NAME NOESY-1D

PF1EXP 1

PF1PROC 1

單響 EDPROJ2 的 [ed] 並鍵入如下所述後單響 [save] 以儲存此參數設定

PF2DU u

PF2USER guest

PF2NAME NOESY-1D

PF2EXP 1

PF2PROC 1

(2) 單響 [save] 以跳出 edg 模式。

(3) 鍵入 *setti* 指令並修改標題 (title) 的內容。

(4) 鍵入 *view* 指令以觀察欲畫出的頻譜。

(5) 鍵入 *plot* 指令來畫出頻譜。

NOESY 表1： NOESY 實驗的收訊參數 (acquisition parameters)

F2 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
PULPROG	noesygptp	NOESY 實驗在 F1 頻道上使用 TPPI 的技巧
TD	2k	組成 F2 維度上 FID 的點數
NS		實驗次數必需為 2 的整數倍以完成相位循環
DS	16 或 32	dummy scan 的次數
D1	2 sec	弛豫用的時間；應設為約 T_1 時間的 1.25 倍左右
D8	650 msec	mixing time 的大小與 T_1 的數量級差不多。對於分子量大的分子，mixing time 的設定約 120 msec 左右

D16	200 usec	梯度磁場恢復時間，可設為 50 ~ 450 usec
D20		D20 = D8*0.5 – P16 – D16
PL1		氫譜的高強度脈衝值
P1		由 *paropt* 所決定 ^{1}H 的 90° 脈衝時間
P2		^{1}H 的 180° 脈衝時間，應為 2 倍的 P1 值
P16	1 msec	脈衝磁場梯度作用時間
SW		F2 維度的頻譜寬度 (取用 /NOESY-1D/1/1 之值)
O1		F2 維度的基準值 (取用 /NOESY-1D/1/1 之值)
GP1	SINE.100	第一個脈衝磁場梯度的檔案名稱
GP2	SINE.100	第二個脈衝磁場梯度的檔案名稱
GPZ1	40	第一個脈衝磁場梯度的 Z 方向強度的百分比
GPZ2	–40	第二個脈衝磁場梯度的 Z 方向強度的百分比
F1 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
TD	256	F1維度的實驗次數
ND0	2	每次循環的 D0 數目，TPPI 下 ND0 設為 2
IN0	1/(2*SW) = DW	t_1 遞增值；應為 F2 維度的 DW 值
SW		F1 維度的頻譜寬度 (取用 /NOESY-1D/1/1 之值)
SR		F1 維度的 SR 值 (取用 /NOESY-1D/1/1 之值)

NOESY 表2： NOESY 實驗的數據處理參數 (data processing parameters)

F2 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
SI	1k	組成 F2 維度上頻率空間的點數
WDW	SINE	將 F2 維度上的數據點乘上 phase-shifted sine 函數
SSB	2	定此sine 函數為 pure cosine 函數
PH_mod	pk	使用手動的方式來調整零次方及一次方的相位
PKNL	TRUE	進行 phase error 的修正
SR		F2 維度的 SR 值 (取用 /NOESY-1D/1/1 之值)
BC_mod	quad	將 FID 減少一個常數值以進行基線的修正

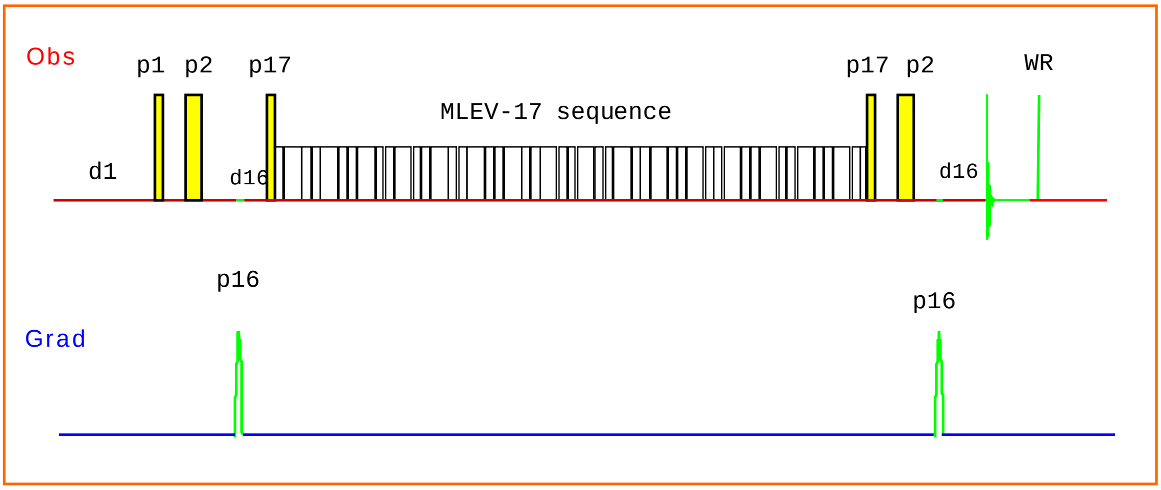
F1 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
SI	512	F1 維度的快速 Fourier 轉換點數
WDW	SINE	將 F1 維度上的數據點乘上 phase-shifted sine 函數
SSB	2	定此sine 函數為 pure cosine 函數
PH_mod	pk	使用手動的方式來調整零次方及一次方的相位
BC_mod	no	不對 F1 維度進行基線的修正
SR		F1 維度的 SR 值 (取用 /NOESY-1D/1/1 之值)
MC2	TPPI	在F1 維度使用 forward single real FT 的方式

附註：

1. 若您的探頭不具備磁場梯度的話，則實驗參數請參考 user's guide 的 Table 43、44。
2. 如果未能於 NOESY 實驗中發現交叉訊號 (cross peaks)，可能是因為當時的環境或是參數值設定不適當。茲提供下述方法去確認交叉訊號：
   - (i) 降低溫度 ⇒ 可改變 τ_C 值、減少 chemical exchange 速率以及增長 T_1 值。
   - (ii) 改變 d8 mixing time 值。
   - (iii) 換不同的 B_0。
   - (iv) 掃瞄次數 ns 必需滿足相位循環 (phase cycling) 的整數倍，以防止因 difference spectra 造成的 mis-match 會使得 J-耦合的效應顯現在 NOESY 實驗的結果上。
   - (v) 請遵循 §13 t_1 noise 綜觀中對 t_1 noise 的防犯措施。

§17 TOCSY 實驗操作指引

前言： TOCSY 是 TOtal Correlation SpectroscopY 的簡寫，也是屬於一種同核種的二維氫譜實驗，可以讓我們獲得所有具有 "J-耦合" 關係的氫核間的關聯性而不是止於像 COSY 只能獲得氫核間的 $^3J_{HH}$ 資訊。它藉助的反應機構是 homonuclear Hartmann-Hahn 同調轉移，所以也稱為 HOHAHA 實驗。在做法上它與 ROESY 實驗類似，是先將氫核激發至 XY 平面上，然後利用所謂的 MLEV 組合式脈衝將之在 XY 平面上予以做 spin-lock 一段時間並且同時造成所有具 "J-耦合" 及偶極作用氫核間的磁矩同調轉移 (coherence transfer)。TOCSY 實驗的一大優點是磁矩轉移後，其交叉訊號 (cross peaks) 與對角線訊號皆為同相位的吸收峰，所以其交叉訊號的外形會比較清晰。一般來說，TOCSY 為 COSY 與 NOESY 的補充實驗，可以讓我們推測出分子中氫核的組織結構。TOCSY 實驗的脈衝程序 **mlevetgp** 如下圖所示：



欲取得一個 TOCSY 二維頻譜，依序可分成下列四個步驟：

(i) 建立一個一維氫譜以取得適用的 sw、o1 及 sr 值；

(ii) 依據該一維氫譜來設定 TOCSY 實驗所需的參數值；

(iii) 依據 TOCSY 實驗特性予以做適當的數據點處理 (data processing)；

(iv) 畫出頻譜。

(i) 建立一個一維氫譜的步驟：

1. 鍵入 *edc* 指令並為此次實驗設定其檔案目錄為 /TOCSY-1D/1/1。
2. 鍵入 *rpar* 指令並選擇 H_probe 用以載入一組適合執行一維氫譜的參數。
3. 鍵入 *wobb* 指令並對探頭做 tune 及 match 的動作。
4. 選 Window menu → BSMS display → 單響 Shim → 單響 Spin on 以旋轉樣品。
5. 鍵入 *lock* 指令，此時系統會自動做磁場鎖定的工作。
6. 對樣品做勻場 (shimming) 的動作。
7. 依序鍵入 *ii* → *rga* → *zg* 指令來執行收集訊號的動作。
8. 依序鍵入 *efp* → *apk* 指令來執行快速 Fourier 轉換及自動相位校正的動作。
9. 調整一維氫譜的左右邊界至所有訊號都可看到的範圍即可，並且依序單響 dp1 及 sw-sfo1 來確認之。此一維氫譜的 sw 與 o1 值將用於 TOCSY 實驗的設定。
10. 鍵入 *eda* 指令並調整 td 值使得 AQ 收訊時間為 FID 時間的 4/3 倍左右。
11. 之後再依序鍵入 *zg* → *efp* → *apk* → *abs* 來取得所需一維氫譜。

注意： 雖然樣品的 90° 脈衝時間 (p1 值) 在大部分的情況下約略為一固定值，但是在水溶液樣品及樣品濃度極大時其 90° 脈衝時間會有所不同 (從 wobble curve 的 match 吸收情形可約略看出)。為了慎重起見，我們建議在時間允許之下以 *paropt* 指令重新來找尋適用於該樣品的 90° 脈衝時間。

(ii) 依據該一維頻譜來設定 TOCSY 實驗：

1. 停止對樣品的旋轉並重新做勻場的動作 (做 2D 實驗時不旋轉樣品!)。
2. 鍵入 *edc* 指令來建立一個檔案目錄為 /TOCSY-2D/1/1。
3. 鍵入 *rpar* 指令並選擇 TOCSY_probe 用以載入一組適合 TOCSY 的參數。
4. 再度鍵入 *eda* 指令，並檢查其內是否符合 “表1” 的 TOCSY 收訊參數設定。
5. 依序鍵入 *ii* → *rga* → *zg* 指令以執行 TOCSY 實驗。

(iii) 依據 TOCSY 實驗特性予以做適當的數據處理 (data processing)：

1. 鍵入 *edp* 指令，並檢查其內是否符合下方 “表2” 的 TOCSY 數據處理參數設定。

2. 鍵入 *xfb* 指令以進行 F1 及 F2 維度的快速 Fourier 轉換。
3. 依序鍵入 *abs2* → *abs1* 指令來執行訊號基線修正的動作。
4. 調整頻譜的相位：

   請參考第 90 頁有關對 NOESY 實驗的相位校正說明。
5. 調整欲畫出之左右邊界值及輪廓圖的階層數 (levels) 的作法：

   單響左方面板的 [limits] 並回答下面問題：

   (i) 輸入欲畫出之頻譜的 F1、F2 左右邊界值 (此相當於一維頻譜的 [dp1])；

   (ii) 輸入欲畫出之輪廓圖的 level 值；

   (iii) 回答 “y” 以顯示輪廓圖 (contour plot)。

   如此螢幕會顯示出被設定的範圍。

附註： 可以再次執行 *abs2* → *abs1* → *sym* 於此同核種二維譜實驗中除去不對稱的雜訊。

(iv) 畫出頻譜：

(1) 鍵入 *edg* 指令並修改下列繪圖參數 ：

單響 EDPROJ1 的 [ed] 並鍵入如下所述後單響 [save] 以儲存此參數設定

PF1DU	u
PF1USER	guest
PF1NAME	TOCSY-1D
PF1EXP	1
PF1PROC	1

單響 EDPROJ2 的 [ed] 並鍵入如下所述後單響 [save] 以儲存此參數設定

PF2DU	u
PF2USER	guest
PF2NAME	TOCSY-1D
PF2EXP	1
PF2PROC	1

(2) 單響 save 以跳出 edg 模式。

(3) 鍵入 *setti* 指令並修改標題 (title) 的內容。

(4) 鍵入 *view* 指令以觀察欲畫出的頻譜。

(5) 鍵入 *plot* 指令來畫出頻譜。

TOCSY 表1： TOCSY 實驗的收訊參數 (acquisition parameters)

F2 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
PULPROG	mlevetgp	TOCSY 實驗在 F1 頻道上使用 TPPI 的技巧
TD	2k	組成 F2 維度上 FID 的點數
NS		實驗次數必需為 8 的整數倍以完成相位循環
DS	16	dummy scan 的次數
D0	3 usec	用於 F1 頻道的 t_1 遞增值
D1	1.5 sec	弛豫用的時間；應設為約 T_1 時間的 1.25 倍左右
D9	67.8 msec	TOCSY 的混合時間，與 P5、P6、P17、L1 值有關
D12	20 usec	已事先定義好的時間，用於功率的轉換
PL1		氫譜的高強度脈衝值
PL10		spin-lock 時所使用的脈衝強度值
P1		由 *paropt* 所決定 ^{1}H 的 90° 脈衝時間
P5		spin-lock 時所使用的 60° 脈衝時間
P6		spin-lock 時所使用的 90° 脈衝時間
P7		spin-lock 時所使用的 180° 脈衝時間
P17	2.5 msec	trim pulse 脈衝時間
L1	約 30 次左右	作為 MLEV 循環式脈衝的循環次數
SW		F2 維度的頻譜寬度 (取用 /TOCSY-1D/1/1 之值)
O1		F2 維度的基準值 (取用 /TOCSY-1D/1/1 之值)
F1 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
TD	256	F1維度的實驗次數
ND0	2	每次循環的 d0 數目，TPPI 下 ND0 設為 2

IN0	1/(2*SW) = DW	t_1 遞增值；應為 F2 維度的 DW 值
SW		F1 維度的頻譜寬度 (取用 /TOCSY-1D/1/1 之值)
O1		F1 維度的基準值 (取用 /TOCSY-1D/1/1 之值)

TOCSY 表2： TOCSY 實驗的數據處理參數 (data processing parameters)

F2 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
SI	512	組成 F2 維度上頻率空間的點數
WDW	SINE	將 F2 維度上的數據點乘上 phase-shifted sine 函數
SSB	2	定此 sine 函數為 pure cosine 函數
PH_mod	pk	
PKNL	TRUE	進行 phase error 的修正
SR		F2 維度的 SR 值 (取用 /TOCSY-1D/1/1 之值)
BC_mod	quad	將 FID 減少一個常數值以進行基線的修正
F1 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
SI	512	F1 維度的快速 Fourier 轉換點數
WDW	SINE	將 F1 維度上的數據點乘上 phase-shifted sine 函數
SSB	2	定此 sine 函數為 pure cosine 函數
PH_mod	pk	
BC_mod	no	不對 F1 維度進行基線的修正
SR		F1 維度的 SR 值 (取用 /TOCSY-1D/1/1 之值)
MC2	TPPI	在F1 維度使用 forward single real FT 的方式

註：若您的探頭不具備磁場梯度的話，則實驗參數請參考 user's guide 的 Table 47、48。

§18 反式探頭與反式實驗的革命

1991 年諾貝爾化學獎惟一得獎人 R. Ernst 教授，其獲獎的三大原因之一在於其對 NMR 波譜學中多維頻譜學 (multi-dimensional spectroscopy) 的理論基礎奠定以及實驗應用推廣。隨著多維譜的研究發展，使人們能更容易且準確地在不破壞分子結構下對分子做熱力學上的結構鑑定與動力學上的探討。

在前面幾節中我們所介紹的 COSY、NOESY、TOCSY 實驗可以提供同核種氫原子核之間的 J-耦合鍵結及空間上的資訊。然而在實際情形上，雖然氫原子核的相對靈敏度居所有原子核之冠，然而構成絕大多數有機、無機以及生物體的分子，其鍵結時的核心成員仍是一些靈敏度不甚高的核種 (像 ^{13}C，^{15}N，^{19}F，^{31}P …)，因此異核種二維頻譜實驗更有其重要性。有些異核種二維頻譜的交叉訊號 (cross peaks) 能提供 ^{13}C 與 ^{1}H 之間直接耦合 $^{1}J_{CH}$ 的證據，因此這一類的 碳-氫 二維譜實驗相對上可以提供比同核種二維譜實驗更 “直接” 或是 “互補” 的資訊。

為了改善多維譜實驗在靈敏度上不足的缺點，在液態 NMR 實驗中波譜學家利用 “J-耦合” (J-coupling) 的 “同調轉移” (coherence transfer) 觀念，設計出 “反式脈衝程序” 的實驗，並將此技巧應用於多維頻譜實驗上以增加測量時的靈敏度。$^{1}J_{CH}$ 耦合常數的大小與 ^{13}C 本身的軌域混成有關。一般而言，當 ^{13}C 的混成軌域為 sp^3 時，$^{1}J_{CH} \cong 125$ Hz；當 ^{13}C 的混成軌域為 sp^2 時，$^{1}J_{CH} \cong 150$ Hz；當^{13}C 的混成軌域為 sp 時，$^{1}J_{CH} \cong 250$ Hz。故一般我們假設不同 C-H 之間的 J-耦合平均值為 $\langle ^{1}J_{CH} \rangle_{avg} \cong 145$ Hz。

除此之外，在分子結構中常常會遇到一些沒有與氫直接鍵結的 “四級碳”，因此有時候我們也需要能夠取得 $^{2}J_{CH}$ 和 $^{3}J_{CH}$ … 等等 “long range” J-coupling 的異核種二維譜實驗以補足上述只能得到 $^{1}J_{CH}$ 資訊的不足，這對於 “四級碳” 的鑑定有實質上的幫助。通常 $^{1}J_{CH}$ 的大小在 120 ~ 250 Hz 之間而 $^{2}J_{CH}$ 約為 $^{1}J_{CH}$ 的 1/10 ~ 1/20 倍，因此我們一般將 $^{2}J_{CH}$ 的平均值設定為 5 ~ 10 Hz。由於演化時間會反比於 $^{2}J_{CH}$ 的大小，所以對於十分小的 碳–氫 鍵結 (譬如說 1 ~ 2 Hz)，T_2 弛豫會使得其強度變得很弱。

在同調轉移的技巧上，反式實驗在準備期與混合期的程序如下表八所示：

脈衝程序	Preparation 方式	Mixing 方式
HSQC	INEPT	reversed-INEPT
HMQC	$^1J_{HX}$-filter	refocused $^1J_{HX}$-filter
HMBC	$^1J_{HX}$-filter $^2J_{HX}$-filter, $^3J_{HX}$-filter	$(\pi/2)_X$

表八： HSQC、HMQC、HMBC 的反式實驗在準備期與混合期的程序。

如果我們只考慮由於旋磁比 γ (gyromagnetic ratio) 所造成在二維異核頻譜實驗中同調轉移時對訊雜比 (S/N) 的增進關係：

$$S/N \propto \gamma_{source}(\gamma_{observed})^{3/2}$$

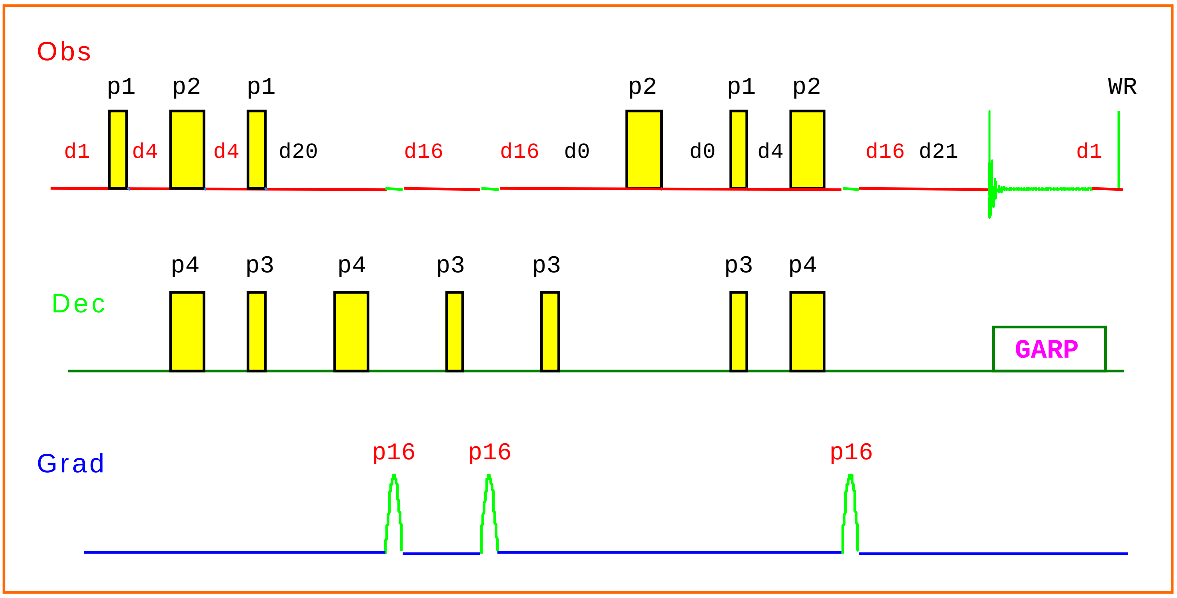
則磁矩先由高旋磁比之氫原子核傳遞至低旋磁比之原子核，再由低旋磁比之原子核傳回高旋磁比之原子核，可以造成偵測靈敏度提升至 32 倍 (如果 γ_{source} 是 ^{13}C 核) 至 300 倍 (如果 γ_{source} 是 ^{15}N 核) 的 “環遊式極化轉移” 概念就說明了反式實驗可以大幅提昇訊雜比/靈敏度的事實。基於靈敏度上的考量，多維譜異核實驗皆是測量氫原子核的訊號。

BRUKER 公司提供了 “反式探頭” (inverse probehead) 的選擇。其探頭的設計原理是將較靈敏的氫核探頭置於探頭的內層而把較不靈敏的其它核種的探頭置於探頭的外層 (圖三十一)。配合 “反式實驗” 的技術，如此可以更增加測量氫核時在靈敏度上的增加如上面所述。

以下數節要介紹三種異核二維頻譜的反式實驗：HSQC、HMQC 及 HMBC。這些是目前常用於所謂 “環遊式極化轉移” (round-trip polarization transfer) 的脈衝程序。基於靈敏度上的考量，反式探頭配合環遊式極化轉移技術的反式實驗構成了異核二維譜的極大優勢。因此即使在較稀薄的樣品濃度下，它仍然能取代舊式的 H-X COSY 及 COLOC 實驗而測得滿意的異核二維頻譜。

§19 HSQC 實驗操作指引

前言： 目前要介紹的主題是一種常用於所謂 “環遊式極化轉移” (round-trip polarization transfer) 的異核二維譜 HSQC 脈衝程序 (它有時候也稱為 Overbodenhausen 實驗)。HSQC 是 Heteronuclear Single-Quantum Correlation spectroscopy 的簡寫。由 HSQC 實驗結果我們可以獲得 $^{1}J_{CH}$ (或是 $^{1}J_{NH}$) 的資訊。其原理是利用 INEPT 程序先將磁矩經由 $^{1}J_{CH}$ 的 J–耦合作用 (得到 $2I_ZS_Z$ 項) 從氫原子核傳至碳原子核 (或是 ^{15}N 原子核)，經過演化時間後，最後再利用一次 “反方向” 的 INEPT 程序將磁矩經 $^{1}J_{CH}$ 的 J-耦合作用從碳原子核傳至氫原子核而予以測量靈敏度較大的氫原子核。如果配合 Echo/Anti-echo 的應用，則可以抵消部分水分子訊號。而 sensitivity enhancement 的技術的應用又可以增加訊號靈敏度約達 1.4 倍。大體上 HSQC 比 HMQC 實驗有較高的訊雜比 (S/N ratio)，因此較適用於稀薄的生化樣品上。HSQC 實驗的脈衝程序 **invigptp** 如下圖所示：



欲取得及畫出一個 HSQC 頻譜，依序可分成下列四個步驟：

(i) 建立一個一維氫譜及一個一維去氫耦合碳譜 $^{13}C\{^{1}H\}$；

(ii) 依據該一維頻譜結果來設定 HSQC 實驗；

(iii) 依據 HSQC 實驗特性予以做適當的數據點處理 (data processing)；

(iv) 畫出 HSQC 異核二維頻譜圖。

(i) 建立一維頻譜的步驟：

1. 鍵入 *edc* 指令並為此一維氫譜實驗設定其檔案目錄為 /HSQC-H/1/1。
2. 鍵入 *rpar* 指令並選擇 H_probe 用以載入一組適合執行一維氫譜的參數。
3. 鍵入 *wobb* 指令並 tune 及 match 探頭。
4. 鍵入 *lock* 指令，此時系統會自動做磁場鎖定的工作。
5. 對樣品做勻場 (shimming) 的動作。
6. 依序鍵入 *ii* → *rga* → *zg* 指令來執行收集訊號的動作。
7. 依序鍵入 *efp* → *apk* 指令來執行快速 Fourier 轉換及自動相位校正的動作。
8. 調整一維氫譜的左右邊界至所有訊號都可看到的範圍即可，並且依序單響 [dp1] 及 [sw-sfo1] 來予以確認之。
9. 鍵入 *eda* 指令並依 FID 的收斂情形來調整 td 值使得 AQ 收訊時間為 FID 長度的 4/3 倍左右。之後再依序鍵入 *zg* → *efp* → *apk* → *abs* 來取得該一維氫譜。此一維氫譜的 sw 值與 o1 值將用於 HSQC 實驗的 SW(F2) 與 O1(F2) 值設定之用。
10. 一維碳譜的設定與一維氫譜類似，我們以 *edc* 定其檔案目錄為 /HSQC-C/1/1，並將此一維碳譜的 sw 值與 o1 值作為 HSQC 實驗的 SW(F1) 與 O2(F1) 設定之用。

注意： 雖然樣品的 90° 脈衝時間 (p1 值) 在大部分的情況下約略為一固定值，但是在水溶液樣品及樣品濃度極大時其 90° 脈衝時間會有所不同 (從 wobble curve 的 match 吸收情形可約略看出)。為了慎重起見，我們建議在時間允許之下以 *paropt* 指令重新來找尋適用於該樣品的 90° 脈衝時間。

(ii) 依據該一維頻譜之 o1、sw 及 p1 值來設定 HSQC 實驗：

1. 鍵入 *edc* 指令來建立一個檔案目錄為 /HSQC-2D/1/1。
2. 鍵入 *rpar* 指令並選擇 HSQC_probe 用以載入一組適合執行 HSQC 的參數。
3. 再度鍵入 *eda* 指令，並檢查其內是否符合下方 “表1” 的 HSQC 參數設定。
4. 依序鍵入 *ii* → *rga* → *zg* 指令以執行 HSQC 實驗。

(iii) 依據 HSQC 實驗特性予以做適當的數據處理 (data processing)：

1. 鍵入 *edp* 指令，並檢查其內是否符合下方 "表2" 的 HSQC 數據處理參數設定。
2. 鍵入 *xfb* 指令以進行 F1 及 F2 維度的快速 Fourier 轉換。
3. 依序鍵入 *abs2* → *abs1* 指令來執行訊號基線修正的動作。
4. 調整頻譜的相位：

   請參考第 90 頁有關對 NOESY 實驗的相位校正說明。
5. 再依序鍵入 *abs2* → *abs1* 指令來執行訊號基線修正的動作。
6. 調整欲畫出之左右邊界值及輪廓圖的 levels 之作法：

   單響左方面板的 limits 並回答下面問題：

   (i) 輸入欲畫出之頻譜的 F1、F2 左右邊界值 (此相當於一維頻譜的 dp1)；

   (ii) 輸入欲畫出之輪廓圖的 level 值；

   (iii) 回答 "y" 以顯示輪廓圖 (contour plot)。

   如此螢幕會顯示出被設定的範圍。

(iv) 畫出頻譜：

(1) 鍵入 *edg* 指令並修改下列繪圖參數 ：

單響 EDPROJ1 的 ed 並鍵入如下所述後單響 save 以儲存此參數設定

```
PF1DU     u
PF1USER   guest
PF1NAME   HSQC-C
PF1EXP    1
PF1PROC   1
```

單響 EDPROJ2 的 ed 並鍵入如下所述後單響 save 以儲存此參數設定

```
PF2DU     u
PF2USER   guest
PF2NAME   HSQC-H
PF2EXP    1
PF2PROC   1
```

(2) 單響 save 以跳出 edg 模式。

(3) 鍵入 *setti* 指令並修改標題 (title) 的內容。

(4) 鍵入 *view* 指令以觀察欲畫出的頻譜。

(5) 鍵入 *plot* 指令來畫出頻譜。

HSQC 表1： HSQC 實驗的收訊參數 (acquisition parameters)

F2 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
PULPROG	invigptp	
TD	2k	組成 F2 維度上 FID 的點數
NS		實驗次數必需為 1 的整數倍以完成相位循環
DS	16	dummy scan 需為掃瞄次數 NS 的 2 倍以上
D1	1.5 sec	弛豫用的時間；應設為約 T_1 時間的 1.25 倍左右
D4	1.725 msec	$1/(4*{}^1J_{HX})$ 的平均值
D16	200 usec	梯度磁場恢復時間，可設為 50 ~ 450 usec
D20		D20 = P16 + D16
D21		D21 = D4 – P16 – D16 – D13 – 4 usec
P1		由 *paropt* 所決定 ^{1}H 的 90° 脈衝時間
P2		^{1}H 的 180° 脈衝時間，應為 2 倍的 P1 值
P3		由 *paropt* 所決定 ^{13}C 的 90° 脈衝時間
P4		^{13}C 的 180° 脈衝時間，應為 2 倍 P3 值
P16	1 msec	脈衝磁場梯度作用時間
PL1		用於氫核的脈衝強度
PL2		用於碳核的脈衝強度
PL12		用於 GARP 組合式脈衝的脈衝強度
cnst2	145 Hz	${}^1J_{HX}$ 的平均值
CPDPRG2	GARP	除去碳耦合之用的組合式脈衝
PCPD2		用於 GARP 組合式脈衝的 90° 脈衝時間
gp1(z)	80 (^{13}C-^{1}H)	對 (^{15}N-^{1}H) 則採用 80
gp2(z)	30 (^{13}C-^{1}H)	對 (^{15}N-^{1}H) 則採用 30

gp3(z)	20 (^{13}C-^{1}H)	對 (^{15}N-^{1}H) 則採用 8
spnam1	SINE.100	
spnam2	SINE.100	
spnam3	SINE.100	
SW(F2)	F2 維度的頻譜寬度 (取用 /HSQC-H/1/1 之值)	
O1	F2 維度的基準值 (取用 /HSQC-H/1/1 之值)	
F2 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
TD	256	F1維度的實驗次數
ND0	4	每次循環的 D0 數目
IN0	1/(4*SW) = 1/(2*DW)	t_1 遞增值；應為 F1 維度的 0.5*DW 值
SW(F1)		F1 維度的頻譜寬度 (取用 /HSQC-C/1/1 之值)
O2		F1 維度的中央值 (取用 /HSQC-C/1/1 之值)

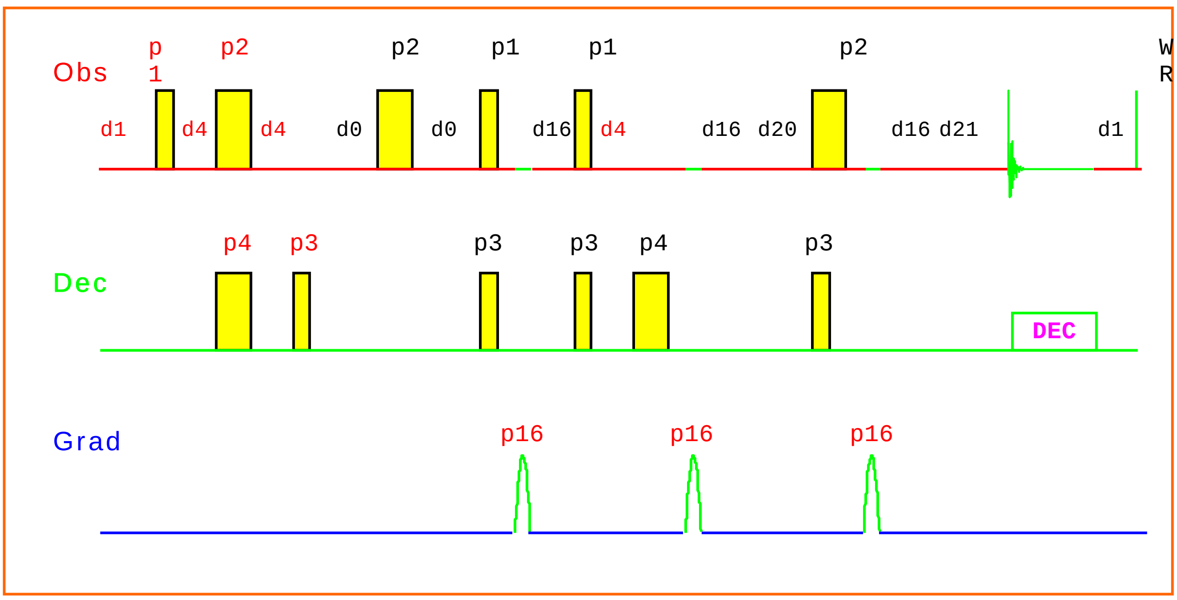
HSQC 表2： HSQC 實驗的數據處理參數 (data processing parameters)

F2 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
SI	1k	組成 F2 維度上頻率空間的點數
WDW	QSINE	將 F2 維度上的數據點乘上 phase-shifted squared sine 函數
SSB	2	定此 squared sine 函數為 pure squared cosine 函數
PH_mod	pk	使用手動的方式來調整零次及一次方的相位
PKNL	TRUE	進行 phase error 的修正
SR		F2 維度的 SR 值 (取用 /HSQC-H/1/1 之值)
BC_mod	quad	將 FID 減少一個常數值以進行基線的修正
F1 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
SI	512	F1 維度的快速 Fourier 轉換點數
WDW	QSINE	將 F1 維度上的數據點乘上 phase-shifted squared sine 函數

SSB	2	定此 squared sine 函數為 pure squared cosine 函數
PH_mod	pk	使用手動的方式來調整零次及一次方的相位
BC_mod	no	不對 F1 維度進行基線的修正
SR		F1 維度的 SR 值 (取用 /HSQC-C/1/1 之值)
MC2	TPPI	

§20 HMQC 實驗操作指引

前言： HMQC 是 Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation spectroscopy 的簡寫。它是屬於 HSQC 的另一種變形方式，理論上應該可以獲得與 HSQC 完全相同的結果，獲得 $^1J_{CH}$ (或是 $^1J_{NH}$) 的資訊。在實際執行上，由於其利用多量子 (multiple-quantum, $2I_XS_Y$) 的反應機制，所以在弛豫以及相位扭曲的考量上較 HSQC 佔優勢。此外，它比較不受 pulse mis-calibration 之影響，所以較適用於一般的有機樣品上。但是，其缺點在於多量子的 transverse relaxation rate 比起 HSQC 的單量子反應機制來得快，造成在 F1 維度上的譜線寬度較大。此外，HMQC 實驗無法去除在 F1 維度上由於 氫-氫 之間的耦合作用，所以說 HSQC 實驗比 HMQC 實驗有較好的頻譜解析度。一般說來 HMQC 實驗較適用於有機樣品而 HSQC 較適用於生化樣品。顧名思義，HMQC 實驗它採用具有 “J-耦合” 的原子核之間才可能經由多量子項來傳遞磁矩的概念，再加上多量子項比單量子項對於相位演化、磁場梯度、及不受 J 值影響等多方面的特性，使得多量子反應機制亦可應用於二維相關頻譜上。這對於獲得異核間的耦合關係而過濾掉一些像水分子這類具高當量濃度的溶劑訊號十分有效。基於 HMQC 脈衝程序比起 H-X COSY 有較高之偵測靈敏度，HMQC 與 HSQC 脈衝程序已成為測量異核間的耦合關係的主要方法並已完全取代 H-X COSY 程式之執行。HMQC 的脈衝程序 **inv4gptp** 如下圖所示：



欲取得及畫出一個 HMQC 頻譜，依序可分成下列四個步驟：

(i) 建立一個一維氫譜及一個一維去氫耦合碳譜；

(ii) 依據該一維頻譜結果來設定 HMQC 實驗；

(iii) 依據 HMQC 實驗特性予以做適當的數據點處理 (data processing)；

(iv) 畫出 HMQC 異核二維頻譜圖。

(i) 建立一維頻譜的步驟：

1. 鍵入 *edc* 指令並為此一維氫譜實驗設定其檔案目錄為 /HMQC-H/1/1。
2. 鍵入 *rpar* 指令並選擇 H_probe 用以載入一組適合執行一維氫譜的參數。
3. 鍵入 *lock* 指令，此時系統會自動做磁場鎖定的工作。
4. 對樣品做勻場 (shimming) 的動作。
5. 鍵入 *wobb* 指令並 tune 及 match 探頭。
6. 依序鍵入 *ii* → *rga* → *zg* 指令來執行收集訊號的動作。
7. 依序鍵入 *efp* → *apk* 指令來執行快速 Fourier 轉換及自動相位校正的動作。
8. 調整一維氫譜的左右邊界至所有訊號都可看到的範圍並且依序單響 [dp1] 及 [sw-sfo1] 來予以確認之。
9. 鍵入 *eda* 指令並調整 td 值使得 AQ 收訊時間為 FID 長度的 4/3 倍左右。之後再依序鍵入 *zg* → *efp* → *apk* → *abs* 來取得該一維氫譜. 此一維氫譜的 sw 值與 o1 值將用於 HMQC 實驗的設定之用。
10. 一維碳譜的設定與一維氫譜類似，我們以 *edc* 定其檔案目錄為 /HMQC/1/1，並將此一維碳譜的 sw 值與 o1 值用於 HMQC 實驗的 sw(F1) 與 o2(F1) 設定之用。

注意： 雖然樣品的 90° 脈衝時間 (p1 值) 在大部分的情況下約略為一固定值，但是在水溶液樣品及樣品濃度極大時其 90° 脈衝時間會有所不同 (從 wobble curve 的 match 吸收情形可約略看出)。為了慎重起見，我們建議在時間允許之下以 *paropt* 指令重新來找尋適用於該樣品的 90° 脈衝時間。

(ii) 依據該一維頻譜之 o1、sw 及 p1 值來設定 HMQC 實驗：

1. 停止對樣品的旋轉並重新做勻場的動作 (做 2D 實驗時樣品不旋轉!)。
2. 鍵入 *edc* 指令來建立一個檔案目錄 (file directory) 為 /HMQC-2D/1/1。
3. 鍵入 *rpar* 指令並選擇 HMQC_probe 用以載入一組適合執行 HMQC 的參數。
4. 再度鍵入 *eda* 指令，並檢查其內是否符合下方 “表1” 的 HMQC 實驗收訊參數設定。
5. 依序鍵入 *ii* → *rga* → *zg* 指令以執行 HMQC 實驗。

(iii) 依據 HMQC 實驗特性予以做適當的數據處理 (data processing)：

1. 鍵入 *edp* 指令，並檢查其內是否符合下方 “表2” 的 HMQC 數據處理參數設定。
2. 鍵入 *xfb* 指令以進行 F1 及 F2 維度的快速 Fourier 轉換。
3. 依序鍵入 *abs2* → *abs1* 指令來執行訊號基線修正的動作。
4. 調整欲畫出之頻譜的相位：

   請參考第 90 頁有關對 NOESY 實驗的相位校正說明。
5. 調整欲畫出之輪廓圖的 levels 及左右邊界值之作法：

   單響左方面板的 limits 並回答下面問題：

   (i) 輸入欲畫出之頻譜的 F1、F2 左右邊界值 (此相當於一維頻譜的 dp1)；

   (ii) 輸入欲畫出之輪廓圖的 level 值；

   (iii) 回答 “y” 以顯示輪廓圖 (contour plot)。

   如此螢幕會顯示出被設定的範圍。

(iv) 畫出頻譜：

(1) 鍵入 *edg* 指令並修改下列繪圖參數 ：

單響 EDPROJ1 的 ed 並鍵入如下所述後單響 save 以儲存此參數設定

```
PF1DU      u
PF1USER    guest
```

PF1NAME HMQC-C

PF1EXP 1

PF1PROC 1

單響 EDPROJ2 的 ed 並鍵入如下所述後單響 save 以儲存此參數設定

PF2DU y

PF2USER guest

PF2NAME HMQC-H

PF2EXP 1

PF2PROC 1

(2) 單響 save 以跳出 edg 模式。

(3) 鍵入 *setti* 指令並修改標題 (title) 的內容。

(4) 鍵入 *view* 指令以觀察欲畫出的頻譜。

(5) 鍵入 *plot* 指令來畫出頻譜。

HMQC 表1： HMQC 實驗的收訊參數 (acquisition parameters)

F2 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
PULPROG	inv4gptp	HMQC 實驗在 F1 頻道上使用 TPPI 的技巧
TD	2k	組成 F2 維度上 FID 的點數
NS		實驗次數必需為 2 的整數倍以完成相位循環
DS	16	dummy scan 的次數
P1		由 *paropt* 所決定 ^{1}H 的 90° 脈衝時間
P2		^{1}H 的 180° 脈衝時間
P3		由 *paropt* 所決定 ^{13}C 的 90° 脈衝時間
P4		^{13}C 的 180° 脈衝時間
PL1		用於氫核的脈衝強度
PL2		用於碳核的脈衝強度
P16	1 msec	梯度磁場脈衝作用時間
D0	3 usec	用於 F1 頻道的 t_1 遞增值

D1	1.5 sec	弛豫用的時間；應設為 T_1 時間的 1.25 倍左右
D2	3.45 msec	$1/(2*^1J_{XH})$
D4	1.725 msec	$1/(4*^1J_{XH})$
D11	30 msec	I/O 所需的轉換時間
D13	3 usec	
D16	200 usec	梯度磁場恢復時間，可設為 50 ~ 450 usec
D20		D20 = D4 – P16 – D16
D21		D21 = D2 – P16 – D16 – 4 usec
cnst2	145 Hz	$^1J_{XH}$ 的平均值
CPDPRG2	GARP	對 $^{13}C/^{15}N$ 做去耦合作用
PCPD2		GARP 所使用的 90° 脈衝時間
PL12		GARP 所使用的脈衝強度
gp1(z)	17 (^{13}C-^1H)	對 (^{15}N-^1H) 則採用 17
gp2(z)	20 (^{13}C-^1H)	對 (^{15}N-^1H) 則採用 50
gp3(z)	25 (^{13}C-^1H)	對 (^{15}N-^1H) 則採用 55
spnam1	SINE.100	
spnam2	SINE.100	
spnam3	SINE.100	
SW		F2 維度的頻譜寬度 (取用 /HMQC-H/1/1 之值)
O1		F2 維度的基準值 (取用 /HMQC-H/1/1 之值)
SR		F2 維度的 SR 值 (取用 /HMQC-H/1/1 之值)
F1 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
TD	256	F1維度的實驗次數
ND0	4	每次循環的 d0 數目
IN0	1/(4*SW) = 1/(2*DW)	t_1 遞增值；應為 F1 維度的 0.5 * DW
SW(F1)		F1 維度的頻譜寬度 (取用 /HMQC-C/1/1 之值)
O2		F1 維度的基準值 (取用 /HMQC-C/1/1 之值)
SR		F1 維度的 SR 值 (取用 /HMQC-C/1/1 之值)

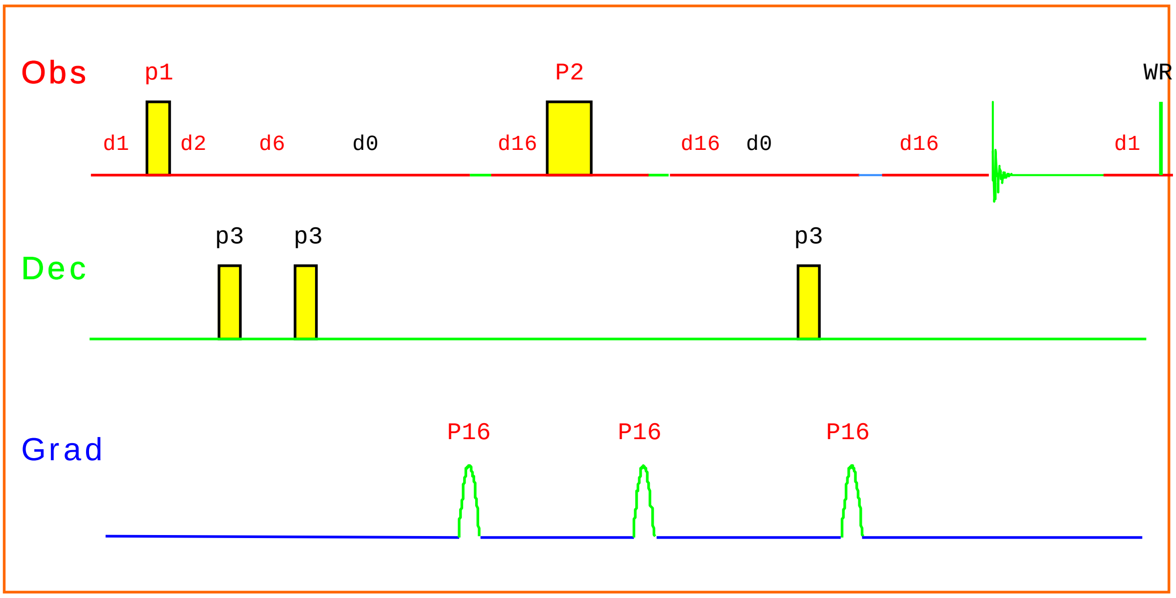
HMQC 表2： HMQC 實驗的數據處理參數 (data processing parameters)

F2 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
SI	1k	組成 F2 維度上頻率空間的點數
WDW	QSINE	將 F2 維度上的數據點乘上 phase-shifted squared sine 函數
SSB	2	定此 squared sine 函數為 pure squared cosine 函數
PH_mod	pk	使用手動的方式來調整零次及一次方的相位
PKNL	TRUE	進行 phase error 的修正
SR		F2 維度的 SR 值 (取用 /HMQC-C/1/1 之值)
BC_mod	quad	將 FID 減少一個常數值以進行基線的修正
F1 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
SI	512	F1 維度的快速 Fourier 轉換點數
WDW	QSINE	將 F2 維度上的數據點乘上 phase-shifted squared sine 函數
SSB	2	定此 squared sine 函數為 pure squared cosine 函數
PH_mod	pk	使用手動的方式來調整零次及一次方的相位
BC_mod	no	不對 F1 維度進行基線的修正
SR		F1 維度的 SR 值 (取用 /HMQC-C/1/1 之值)
MC2	TPPI	在 F1 維度使用 forward single real FT 的方式

註：若您的探頭不具備磁場梯度的話，則實驗參數請參考 user's guide 的 Table 49、50。

§21 HMBC 實驗操作指引

前言： HMBC 是 Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy 的簡寫。基於環遊式極化轉移的靈敏度優勢，HMBC 脈衝程式適用於反式探頭上，並可取代傳統的 COLOC 脈衝程序獲得 $^2J_{CH}$ 及$^3J_{CH}$ 的資訊。由於其多量子及過濾出較小 J_{HX} 值的特性，它適用於異核二維譜中多於一個鍵之間的關聯性 (例如說，當 d6 設定為 62.5 ~ 100 msec 時，約略可獲得 $^2J_{CH}$ 及 $^3J_{CH}$ 的資訊)。在具有四級碳的生化分子辨識上也可以作為 HSQC 實驗的互補實驗。譬如說像在 ^{15}N-labelled 的蛋白質中，可以獲得 ^{15}N 與第 (i+1) 個 α-氫的關聯性；在 ^{13}C–^{1}H 分析中，則常用於 oligosaccharides 之偵測。由於在 d2 演化期間氫的化學位移與耦合效應，所以在 F2 方面無法得純相位的二維譜。也因為演化的時間很長，所以最後不使用一個對稱的演化時間來將磁矩予以聚焦而於收集訊號時直接採用絕對模式的方式來顯示該二維譜。此外，長演化時間也造成 F1 中由於氫–氫耦合所造成的分裂是無法解析的。HMBC 實驗的脈衝程序 **inv4gplplrnd** 圖示如下：



欲取得及畫出一個 HMBC 頻譜，依序可分成下列四個步驟：

(i) 建立一個一維氫譜及一個一維去氫耦合碳譜；

(ii) 依據該一維頻譜結果來設定 HMBC 實驗；

(iii) 依據 HMBC 實驗特性予以做適當的數據點處理 (data processing)；

(iv) 畫出 HMBC 異核二維頻譜圖。

(i) 建立一維頻譜的步驟：

1. 鍵入 *edc* 指令並為此一維氫譜實驗設定其檔案目錄為 /HMBC-H/1/1。
2. 鍵入 *rpar* 指令並選擇 H_probe 用以載入一組適合執行一維氫譜的參數。
3. 鍵入 *lock* 指令，此時系統會自動做磁場鎖定的工作。
4. 對樣品做勻場 (shimming) 的動作。
5. 鍵入 *wobb* 指令並 tune 及 match 探頭。
6. 依序鍵入 *ii* → *rga* → *zg* 指令來執行收集訊號的動作。
7. 依序鍵入 *efp* → *apk* 指令來執行快速 Fourier 轉換及自動相位校正的動作。
8. 調整一維氫譜的左右邊界至所有訊號都可看到的範圍並且依序單響 [dp1] 及 [sw-sfo1] 來予以確認之。
9. 鍵入 *eda* 指令並調整 td 值使得 AQ 收訊時間為 FID 長度的 4/3 倍左 右。之後再依序鍵入 *zg* → *efp* → *apk* → *abs* 來取得該一維氫譜。此一維氫譜的 sw 值與 o1 值將用於 HMBC 實驗的設定之用。
10. 一維碳譜的設定與一維氫譜類似，我們以 *edc* 定其檔案目錄為 /HMBC-C/1/1，並將此一維碳譜的 sw 值與 o1 值用於 HMBC 實驗的 sw(F1) 與 o2(F1) 設定之用。

注意： 雖然樣品的 90° 脈衝時間 (p1 值) 在大部分的情況下約略為一固定值，但是在水溶液樣品及樣品濃度極大時其 90° 脈衝時間會有所不同 (從 wobble curve 的 match 吸收情形可約略看出)。為了慎重起見，我們建議在時間允許之下以 *paropt* 指令重新來找尋適用於該樣品的 90° 脈衝時間。

(ii) 依據該一維頻譜之 o1、sw 及 p1 值來設定 HMBC 實驗：

1. 停止對樣品的旋轉並重新做勻場的動作 (做 2D 實驗時樣品不旋轉!)。
2. 鍵入 *edc* 指令來建立一個檔案目錄 (file directory) 為 /HMBC-2D/1/1。
3. 鍵入 *rpar* 指令並選擇 HMBC_probe 以載入一組適合執行 HMBC 的參數。

4. 再度鍵入 *eda* 指令，並檢查其內是否符合下方“表1”的 HMBC 實驗收訊參數設定。

5. 依序鍵入 *ii* → *rga* → *zg* 指令以執行 HMBC 實驗。

(iii) 依據 HMBC 實驗特性予以做適當的數據處理 (data processing)：

1. 鍵入 *edp* 指令，並檢查其內是否符合下方“表2”的 HMBC 數據處理參數設定。

2. 鍵入 *xfb* 指令以進行 F1 及 F2 維度的快速 Fourier 轉換。

3. 依序鍵入 *abs2* → *abs1* 指令來執行訊號基線修正的動作。

4. 調整欲畫出之輪廓圖的 levels 及左右邊界值之作法：

單響左方面板的 [limits] 並回答下面問題：

(i) 輸入欲畫出之頻譜的 F1、F2 左右邊界值 (此相當於一維頻譜的 [dp1])；

(ii) 輸入欲畫出之輪廓圖的 level 值；

(iii) 回答“y”以顯示輪廓圖 (contour plot)；

附註：由於 HMBC 頻譜採用絕對值模式，所以不執行相位校正的動作。

(iv) 畫出頻譜：

(1) 鍵入 *edg* 指令並修改下列繪圖參數 ：

單響 EDPROJ1 的 [ed] 並鍵入如下所述後單響 [save] 以儲存此參數設定

```
PF1DU     y
PF1USER   guest
PF1NAME   HMBC-C
PF1EXP    1
PF1PROC   1
```

單響 EDPROJ2 的 [ed] 並鍵入如下所述後單響 [save] 以儲存此參數設定

```
PF2DU     y
PF2USER   guest
PF2NAME   HMBC-H
```

```
PF2EXP    1
PF2PROC   1
```

(2) 單響 save 以跳出 edg 模式°

(3) 鍵入 *setti* 指令並修改標題 (title) 的內容。

(4) 鍵入 *view* 指令以觀察欲畫出的 2D 頻譜圖。

(5) 鍵入 *plot* 指令來畫出頻譜。

HMBC 表1： HMBC 實驗的收訊參數 (acquisition parameters)

F2 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
PULPROG	inv4gplplrnd	
TD	2k	組成 F2 維度上 FID 的點數
NS		實驗次數必需為 2 的整數倍以完成相位循環
DS	16	dummy scan 的次數
P1		由 *paropt* 所決定 ^{1}H 的 90° 脈衝時間
P2		^{1}H 的 180° 脈衝時間
P3		由 *paropt* 所決定 ^{13}C 的 90° 脈衝時間
PL1		用於氫核的脈衝強度
PL2		用於碳核的脈衝強度
P16	1 msec	梯度磁場脈衝作用時間
D0	3 usec	用於 F1 頻道的 t_1 遞增值
D1	1.5 sec	弛豫用的時間；應設為 T_1 時間的 1.25 倍左右
D2	3.45 msec	第一段演化時間，設定為 $1/(2*^{1}J_{XH})$
D6	100 msec	第二段演化時間，一般設定在 60 ~ 100 msec 範圍內
D13	3 usec	
D16	200 usec	梯度磁場恢復時間，可設為 50 ~ 450 usec
cnst2	145 Hz	$^{1}J_{XH}$ 的平均值
GRDPROG	3sine	
gp1(z)	50 (^{13}C-^{1}H)	對 (^{15}N-^{1}H) 則採用 70

gp2(z)	30 (^{13}C-^{1}H)	對 (^{15}N-^{1}H) 則採用 30
gp3(z)	40 (^{13}C-^{1}H)	對 (^{15}N-^{1}H) 則採用 50
spnam1	SINE.100	
spnam2	SINE.100	
spnam3	SINE.100	
SW		F2 維度的頻譜寬度 (取用 /HMBC-H/1/1 之值)
O1		F2 維度的基準值 (取用 /HMBC-H/1/1 之值)
F1 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
TD	256	F1維度的實驗次數
ND0	2	每次循環的 d0 數目
IN0	1/(2 * SW) = DW (X)	t_1 遞增值；應為 F1 維度的 DW 值
SW(F1)		F1 維度的頻譜寬度 (取用 /HMBC-C/1/1 之值)
O2		F1 維度的基準值 (取用 /HMBC-C/1/1 之值)

HMBC 表2： HMBC 實驗的數據處理參數 (data processing parameters)

F2 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
SI	1k	組成 F2 維度上頻率空間的點數
WDW	QSINE	將 F2 維度上的數據點乘上 phase-shifted squared sine 函數
SSB	2 ~ 4	定此 squared sine 函數為 pure squared sine 函數
PH_mod	no	
PKNL	TRUE	進行 phase error 的修正
SR		F2 維度的 SR 值 (取用 /HMBC-H/1/1 之值)
BC_mod	quad	將 FID 減少一個常數值以進行基線的修正
F1 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
SI	512	F1 維度的快速 Fourier 轉換點數
WDW	QSINE	將 F2 維度上的數據點乘上 phase-shifted squared sine 函數

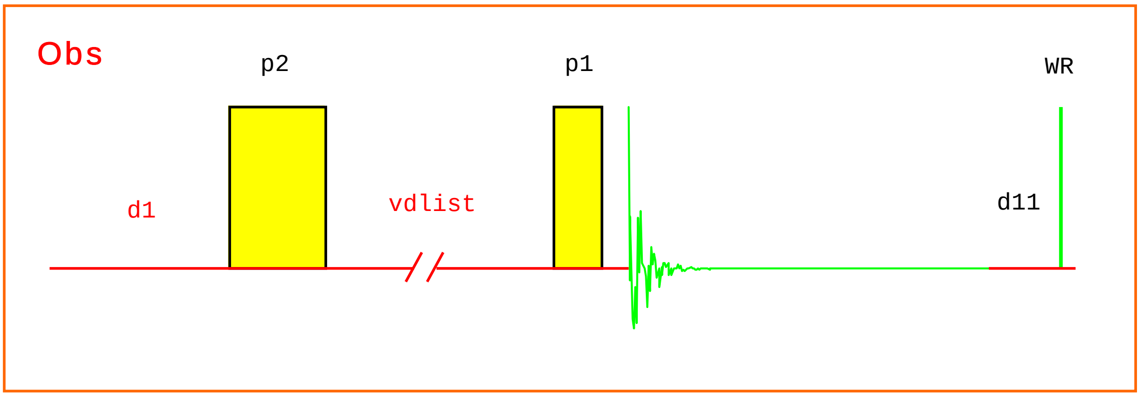
SSB	2	定此 sine-modulated 函數為 pure cosine 函數
PH_mod	mc	定此為絕對值模式 (magnitude mode)
BC_mod	no	不對 F1 維度進行基線的修正
SR		F1 維度的 SR 值 (取用 /HMBC-C/1/1 之值)
MC2	QF	在F1 維度使用 forward quadrature complex FT 的方式

註：若您的探頭不具備磁場梯度的話，則實驗參數請參考 user's guide 的 Table 51、52。

第IV部分：其它實驗操作說明

§22 T_1 實驗操作指引

前言： 此處我們針對 “高解析” NMR 頻譜，對使用 “反轉–回復” (Inversion-Recovery) 的方式來求得某化學位移訊號的 T_1 值做一逐步的解說。所謂 “高解析” NMR 頻譜，我們是假設每一個化學位移位置上只含有一種訊號。T_1 實驗的脈衝程序 **t1ir** 如下圖所示：



欲取得及畫出一組 T_1 陣列式頻譜，依序可分成下列四個步驟：

(i) 建立一組陣列式一維頻譜 (1D arrayed spectra)；

(ii) 依據該一維頻譜來指定欲求得其 T_1 值的化學位移位置；

(iii) 設定作為 T_1 “曲線擬合” (curve fitting) 的參數以求得其 T_1 值；

(iv) 畫出堆積式 T_1 陣列頻譜。

(i) 建立一組陣列式一維頻譜 (1D arrayed spectra)：

1. 鍵入 *edc* 指令並為此次實驗設定其檔案目錄為 /T1-data/1/1。
2. 鍵入 *rpar* 指令並選擇 H_probe 用以載入一組適合執行一維氫譜的參數。
3. 鍵入 *lock* 指令，此時系統會自動做磁場鎖定的工作。
4. 對樣品做勻場 (shimming) 的動作。
5. 鍵入 *wobb* 指令並 tune 及 match 探頭。
6. 依序鍵入 *ii* → *rga* → *zg* 指令來執行收集訊號的動作。

7. 依序鍵入 *efp* → *apk* 指令來執行快速 Fourier 轉換及自動相位校正的動作。如有需要，可單響 [phase] 以手動方式來執行相位校正。
8. 鍵入 *edc* 指令並定此一維陣列式實驗的檔案目錄為 /T1-data/2/1。
9. 鍵入 *eda* 指令並選擇 PARMODE = [2D] 將此一維陣列式實驗改 2D 模式。
10. 鍵入 *edlist* 指令並以滑鼠左鍵單響 vd。此時我們定此 vdlist 檔案的名稱為 t1-tau 之後並輸入其內容。基於弛豫方面的考量，該 vdlist 的第一個值是一個十分大的正數而最後一個值是一個大於所有訊號 5 倍 T_1 的正數。舉例來說，以下是一實用的範例：

20 s
10 s
6 s
4 s
2 s
1 s
0.3 s
0.1 s
0.01 s
0.001 s

11. 設定完 vdlist 內容後鍵入 *eda* 指令並依照下方 “表1” 來設定適當的參數。
12. 鍵入 *zg* 指令後就可以取得此一維陣列式 FIDs 了。
13. 鍵入 *edp* 指令並依下方 “表2” 的內容來設定數據處理參數。
14. 鍵入 *xf2* 指令來對該陣列式一維 FIDs 做快速 Fourier 轉換。

(ii) 依據該一維頻譜來指定欲求得其 T_1 值的化學位移位置：

在執行 T_1 值的曲線擬合 (curve fitting) 以獲得實驗所得之 T_1 值之前，我們必須先

指定要針對那一些化學位移位置的訊號予以計算其 T_1 值。這包含了 "積分檔案" (integration file) 與 "基線點檔案" (baseline point file) 的設定。

(1) 鍵入 *rser 1* 來取出第 1 個頻譜並以手動方式對其做相位的校正。

(2) 單響 [intrng] 以進入積分模式。移動游標至主螢幕上 (此時游標的外形會變成 ⇩)。積分的區間設定是由中央的滑鼠鍵來予以設定：第一次單響中央鍵會設定積分區間的左邊界而第二次單響中央鍵會設定積分區間的右邊界。重覆此動作以完成所有區間的設定。

(3) 單響 [return] 後就可以將由步驟 (2) 所設定的積分區間予以儲存並同時回到一維的模式。

(4) 鍵入 *wmisc* 指令並選擇 [intrng] 以顯示出所有已儲存的積分檔案。此刻，我們將目前步驟 (2) 所設定的積分檔案定其名為 t1-intrng。

(5) 鍵入 *basl* 指令並單響 [def-pts] 後，開始指定要對那一些化學位移位置的訊號求其 T_1 值。此步驟與上面積分區間的設定步驟十分類似，但要注意的是每一個積分區間 "只能" 有一個最大值。單響 [return] 並選擇 [Save & retuen] 後就可以把步驟 (5) 所設定的化學位移位置予以儲存並同時回到一維的模式。

(6) 鍵入 *wmisc* 指令並選擇 [baslpnts] 以顯示出所有已儲存的基點檔案。此時，我們將目前剛設定的化學位移位置檔案定其名為 t1-bas。

(7) 單響 [return] 先回到一維螢幕模式，之後再單響 [2D] 以回到二維的螢幕模式。

(iii) 設定作為 T_1 曲線擬合 (curve fitting) 的參數以求得其 T_1 值：

一旦頻譜已取得而且積分檔案與化學位移位置檔案也予以定義好了之後，我們就可使用自動程式 *proc_t1* 來做 T_1 值的計算了。其操作如下所述：

(1) 鍵入 *xau proc_t1* 指令以啟動計算 T_1 值的自動程式並依序回答下列問題：

Enter fid no. for phase determination :	1 (取第 1 個頻譜做相位校正)
Enter left limit for baseline correction :	14 (定頻譜的左邊界為 14 ppm)
Enter right limit for baseline correction :	–1 (定頻譜的右邊界為 －1 ppm)
Enter no. of drift points :	20 (定義 drift 的點數)
Enter name of baseline point file :	t1-bas

Enter name of integral range file : `t1-intrng`

Enter name of VD list to use : `t1-tau`

Enter calc. type (T1=1, T2=2) : 1 (此處以 T_1 曲線擬合為例)

如此程式會自動算出所有化學位移位置的 T_1 值並以 `t1ir` 的檔名存於以 *edo* 指令所指定的 `$CURPRIN` 內。

(2) 我們可以選取 Analysis menu → The T_1/T_2 relaxation 來觀察第一個化學位移位置的實驗結果。我們也可以鍵入 *nxtp* 指令來顯示下一個化學位移位置的結果。再鍵入 *ct1* 指令來單獨求得該化學位移位置的 T_1 值。

(3) 以下是以互動的方式來除去螢幕上明顯不適合的數據點的方法：

(a) 先移動游標至螢幕上

(b) 單響一下滑鼠的左鍵 (此時游標的外形會變成 ⇩)。

(c) 移動游標至欲除去的數據點上並單響滑鼠的左鍵以除去不適合的數據點。

(4) 鍵入 *ct1* 指令來對目前化學位移位置的數據點做 T_1 值的計算。

(5) 鍵入 *nxpt* 指令將游標移至下一個化學位移位置。而重覆步驟 (3)、(4) 以求得該化學位移位置數據點的 T_1 值計算。如果想一次算出所有化學位移位置數據點的 T_1 值，則可以鍵入 *dat1* 指令來完成。

(6) 計算所得的 T_1 值會顯示於由 *edo* 所定義的裝置。在 `edo` 的模式下，press-and-drag 滑鼠左鍵來定義 $CURPRIN 的輸出裝置。

(iv) 畫出堆積式頻譜 (stacked plot)：

堆積式頻譜是由 *stack2d* 指令取用 `stackplot` 參數予以畫出的。需注意的是 `stackplot` 乃是一個一維的繪圖參數。

(1) 先單響 [dp1] 來定義欲畫出頻譜的左右邊界。

(2) 鍵入 *edg* 指令來啟動繪圖參數的設定。請確定 `SPEC` 被設為 `YES` 而 `XAXIS`、`YAXIS`、`TITLE`、`INTEGR`、`PLABELS` 及 `PARAM` 被設為 `NO`。單響 `EDSPECT`的 `ED` 並修改繪圖參數。“表3” 是一組適用於 A4 紙張的繪圖參數。

(3) 等這些繪圖參數設定完成後，鍵入 *wpar* `stackpar plot` 以把這些繪圖參

數值存成 stackpar 檔。

(4) 當這些一維繪圖參數設定完成後，單響 2D 以回到二維模式。

(5) 鍵入 *stack2d* 指令並回答下列問題來啟動繪圖動作。

```
Enter NAME :            t1-data
Enter EXPNO :              2
Enter PROCNO :             1
Enter USER :            guest
Enter DISK :            u
repeat dialog (r) or continue (c) : c
Enter first row to plot : 1
Enter row increment :      1
Enter number of rows :     10
Enter row for scaling :    10
Enter x increment [cm] :   0.2
Enter y increment ][cm] : 1.2
```

如此一組陣列式 (arrayed) 一維頻譜就被輸出至由 *edo* 所設定的 $CURPRIN 位置了。

註：吾人可以用 *edgw* 指令來預先觀察將列印的結果。而更方便的方式是使用 XWINPLOT 繪圖軟體來處理這一類比較複雜的頻譜列印。

表1 ： “反轉–回復” (Inversion-Recovery) 實驗的收訊參數 (acquisition parameters)

F2 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
PULPROG	t1ir	t1irpg 則適用於有磁場梯度配備的探頭
TD	16k	
NS		掃瞄次數應為 8 的整數倍以滿足全部的相位循環
DS	4	dummy scan 的次數

PL1		F1 頻道上的高強度脈衝值
P1		F1 頻道上的高強度 90° 脈衝時間
P2		F1 頻道上的高強度 180° 脈衝時間
D1	10 s	弛豫延遲時間，至少應為 T_1 值的 1.5 倍
D11	30 msec	已預設好的磁碟機 讀/寫 所需轉換時間
L4	10	遞迴次數; 其值與 VDLIST 內容的個數值相同
VDLIST	t1-tau	VDLIST 的檔案名稱其內含有各種延遲時間
F1 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
TD	10	陣列式實驗的個數

表2 ： Inversion-Recovery 實驗的數據處理參數 (data processing parameters)

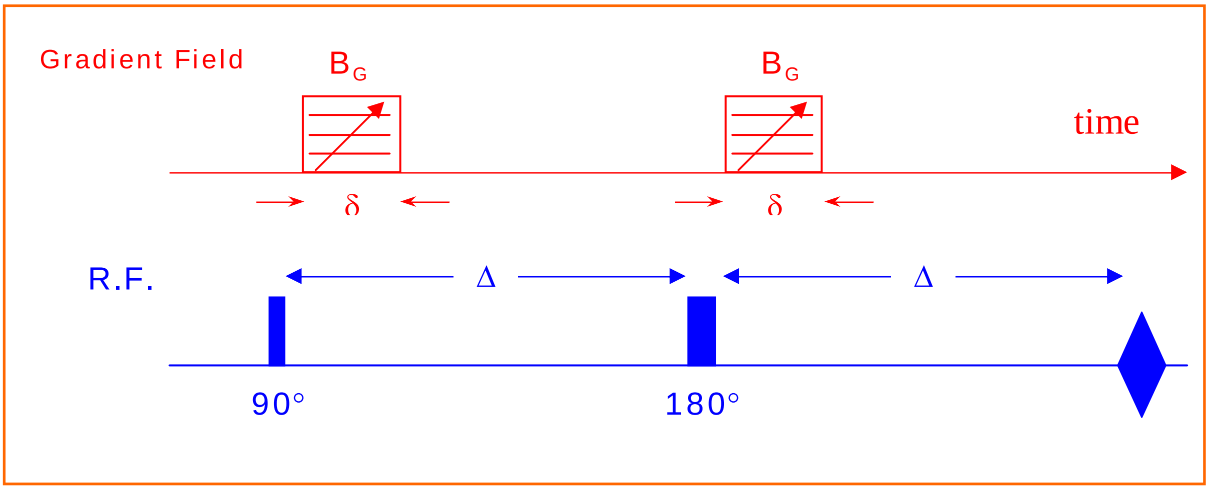
F2 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
SI	8k	
SF		
WDW	EM	
LB	1 Hz	
PH_mod	no	
PKNL	TRUE	使用數位式過濾器時必需啟動此功能
BC_mod	quad	
F1 維度上的參數設定		
參數名	參數值	註解
SI	16	必需設定為一個大於 VDLIST 個數且為 2 的冪次方
BC_mod	no	
MC2	QF	

表3 ： 適用於 A4 紙張的繪圖參數

<table>
<tr><th>參數名稱</th><th>參數值</th><th>註解</th></tr>
<tr><td>SXLLEFT</td><td>2.0 cm</td><td></td></tr>
<tr><td>SYLLEFT</td><td>1.0 cm</td><td></td></tr>
<tr><td>CX</td><td>20.0 cm</td><td></td></tr>
<tr><td>SHEI</td><td>20.0 cm</td><td></td></tr>
<tr><td>F1P</td><td rowspan="6" colspan="2">這些參數與我們在 dp1 中的設定值相同</td></tr>
<tr><td>F1</td></tr>
<tr><td>F2P</td></tr>
<tr><td>F2</td></tr>
<tr><td>PPMCM</td></tr>
<tr><td>HZCM</td></tr>
<tr><td>DHEI</td><td>19.0 cm</td><td></td></tr>
<tr><td>SZERO</td><td>4.0 cm</td><td></td></tr>
<tr><td>CY</td><td>6.0 cm</td><td></td></tr>
</table>

§23 擴散 (Diffusion) 實驗操作指引

一般來說，傳統 NMR 所分析的樣品是經過分離與純化過後的單一種分子 (並且假設溶劑與待測樣品互相不影響且在頻譜的辨識上不會產生混淆)。對於無法完全分離或純化的多種分子混合樣品而言，除了以 LC-NMR 來處理外，還可以依各成份的分子量大小以及在不同溶劑中的擴散程度來區分之。由於同一分子內所有訊號的擴散係數值約略是相同的，因此藉由擴散實驗可以區分出在頻譜上各訊號是否分屬於不同的分子。此外，在相變化時，分子的擴散係數值會有明顯的差異。因此藉由擴散實驗也有助於分子動力學上的研究。擴散實驗的脈衝程度 **diffsen** 如下所示：



以下說明執行擴散實驗的相關步驟：

1. 以 *edc* 指令開啟一個新的檔案路徑並以 *rpar* `H_probe all` 指令取用一組適用於氫譜實驗的參數 → 鍵入 *eda* 指令並且改 `PULPROG = zg`。
2. 置入樣品管。樣品的體積約 0.5 c.c. 並調整樣品管使樣品位於 gauge 的中央標線處。
3. 在 spin off 之下做 *wobble* 動作 (tune & match)。
4. 鍵入 *gs* 指令以 GS mode 來勻場 (鍵入 *acqu* 指令使之轉換至 “Acqu” 模式，然後於 Display menu 下選擇 “Show Time Domain” 或是 “Show Frequency Domain”)。
5. 依序鍵入 *ii* → *rga* → *zg* 以取得一維氫譜。
6. 於 Unix Shell 中進入 /u/exp/stan/nmr/lists/gp 目錄並鍵入 *jot* `cag_par` 以編輯

cag_par 檔案使之成為：

```
1.0
1.0
1.0
0.0  0.0  1.0
0.0  0.1  0.0
0.0  0.0  0.0
```

7. 於 XWINNMR 中以 *edc* 指令開啟另一個新的檔案路徑作為擴散實驗之用並於鍵入 *eda* 指令後改其 PARMODE = 2D。
8. 鍵入 *xau diffsen* 指令後回答下述問題：

number of gradient steps	16
maximum required gradient strength (G/cm)	32
strength of 1st gradient (G/cm)	2
gradient ramp time (ms)	0.5
gradient on time delta (ms)	10
gradient stabilization time (ms)	0.5
gradient amplifier unblank time (ms)	0.03
acquisition size TD	視狀況而定
spectral width (Hz)	視狀況而定
duration of 90 degree pulse (us)	依校正時所得之值
attenuation PL1	依校正時所得之值
number of experiments	8 (相當於 ns 值)
number of dummy experiments	2 (相當於 ds 值)
delay between gradients DELTA = (ms)	20
repetition time = (ms)	3000
gradient orientation along :	Z

9. 回答完所有問題後系統會顯示出吾人設定的參數值，我們可以鍵入 *zg* 指令以執行擴散實驗。

10. 鍵入 *edp* 指令並且改 `PH_mod = pk`。
11. 實驗取樣完成後請鍵入 *xf2* 指令以便將一系列的 F2 實驗做 Fourier 轉換 → 單響左方的 phase icon 以便校正所有 F2 實驗的相位。
12. 鍵入 *rspc 1* 指令以取得第一個 F2 氫譜 → 鍵入 *basl* 指令 → 單響左上方的 def–pts icon → 移動滑鼠至要做測量的吸收訊號上並單響滑鼠左鍵以定義之 → 重 覆上面動作直到所有吸收訊號都被定義 → 單響左方的 return icon → 選擇 Save & return 以定義出那一些訊號位置要測量其擴散係數的動作之後回到主螢幕。
13. 選擇 Analysis menu → Relaxation (T1/T2)。
14. 選擇 Process menu → pd0 ⇒ 此時數據點會顯示在螢幕上。如果沒有看到數據點，可調整左方的 放大/縮小 icon 以將數據點予以顯示在適當的位置上 → 鍵入 *edt1* 指令，並確定 `FCTTYPE = vargrad`。

註： (1) 我們可以先單響滑鼠左鍵使游標外形變成 ⇩，再單響滑鼠中鍵以除去不必要的數據點。

(2) 我們也可以鍵入 *nxtp* 指令來觀察下一組的數據點。

15. 等所有的參數都設定完成之後，我們可以鍵入 "*simfit*" 指令來針對目前螢幕上的數據點做曲線擬合 (curve fitting)；也可以鍵入 "*simfit all*" 指令來一次對所有定義好的訊號數據點做 curve fitting。計算出的結果會依照由 *edo* 指令所設定的 `$CURPRIN` 裝置予以輸出。
16. 欲畫出 T1/T2 curve fitting 的輸出圖，可以使用 XWINPLOT 應用軟體。對 XWINPLOT 有興趣的讀者請參考第 38 頁的 §3 XWINPLOT 應用軟體說明。
17. 再度進入於 Unix Shell 中的 `/u/exp/stan/nmr/lists/gp` 目錄並鍵入 *jot* `cag_par` 以編輯 `cag_par` 檔案使之成為：

```
1.0
1.0
1.0
1.0  0.0  0.0
0.0  1.0  0.0
0.0  0.0  1.0
```

附錄一 ： 字首縮寫詞 (Acronym)

BURP : Band-selective Uniform Rsponse Pure-phase 的縮寫，詳見 P.55。

COSY : COrelation SpectroscopY 的縮寫，詳見 P.83。

CPD : Composote Pulse Decoupling 的縮寫，詳見 P.9。

DANTE : Delays Alternating with Nutation for Tailored Excitation 的縮寫，詳見 P.79。

DEPT : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 的縮寫，詳見 P.62。

DIPSI : Decoupling In the Presence of Scalar Interactions 的縮寫，詳見 P.8。

GARP : Globally optimized Alternating-phase Rectangular Pulses 的縮寫，詳見 P.8。

INEPT : Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer 的縮寫，詳見 P.102。

DQ-COSY : Double-Quantum COSY 的縮寫，詳見 P.85。

HMBC : Heteronuclear Multiple-Bond Correlation 的縮寫，詳見 P.114。

HMQC : Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation 的縮寫，詳見 P.108。

HOHAHA : HOmonuclear HArtmann-HAhn spectroscopy 的縮寫，詳見 P.95。

HSQC : Heteronuclear Single-Quantum Correlation 的縮寫，詳見 P.102。

MEM : Maximum Entropy Method 的縮寫，詳見 P.50。

MLEV : Malcolm LEVitt's decoupling cycle 的縮寫，詳見 P.95。

MRI : Magnetic Resonance Image 的縮寫，詳見 P.47。

NOESY : Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY 的縮寫，詳見 P.88。

ROESY : Rotating-frame Overhauser Enhancement SpectroscopY 的縮寫，詳見 P.95。

TOCSY : TOtal Correlation SpectroscopY 的縮寫，詳見 P.95。

TPPI : Time-Proportional Phase Increment 的縮寫，詳見 P.82。

WATERGATE : A water suppression sequence，詳見 P.67。

WURST : Decoupling dequence using adiabatic pulse，詳見 P.8。

WALTZ-16： 利用組合式脈衝 (composite pulse) { 1 2 3 1 2 3 1 2 3 12 3 } 的概念對氫原子核予以做寬頻式去耦合，詳見 P.8。

附錄二 ： 圖列 (Graph list)

圖十七： (左) 傳統式的氘鎖定方法。此圖表示了傳統的 “類比式” 氘鎖定的實驗結果。由右方的時間軸可以看出，在凌晨時由於車輛並未經過，因此可以把中央不必要的 $^{1}H\{^{12}C\}$ 訊號強度壓抑至兩翼 $^{1}H\{^{13}C\}$ 訊號的 30% 以下；而在白天時，兩翼之衛星訊號則小於中央的訊號。(右) BRUKER 的 “數位式” 氘鎖定方法。此圖顯示了由於 BRUKER 採用數位化及造型波脈衝的氘鎖定方式，造成磁場的穩定性大幅提昇。由實驗結果顯示，不論是白天或是凌晨，中央 $^{1}H\{^{12}C\}$ 訊號的強度總低於兩翼 $^{1}H\{^{13}C\}$ 衛星訊號強度的 25%。

圖十八： 勻場與氘鎖定水平高度的關係圖。

圖十九： (左) 鍵入 `rga` 指令前，一些微弱訊號的強度小於一個最小的單位，所以該訊號會被視為雜訊；(右) 鍵入 `rga` 指令後，原先最強的訊號的強度會達到動力範圍的最大值，因而有些微弱的訊號強度會被放大到大於一個最小的單位所以被視為訊號而非雜訊。

圖二十： `tr` 指令的應用圖示。利用 `tr` 指令，我們可以隨時取出已完成部分的實驗結果並將之做 Fourier 轉換。如果已滿意目前的實驗結果，可以鍵入 `halt` 指令來停止實驗的進行。

圖二十一： Nyquist theorem 告訴我們訊號的取樣速率不得少於最高頻率的 2 倍，否則可能發生如圖所示的情形 (也就是說兩個不同的頻率會被誤認為相同的頻率)。上圖表示當某一個訊號 (dashed line) 的頻率高於 Nyquist 頻率時，則其可能會與另一個頻率 (solid line) 通過相同的資料取樣點 “◎” 而造成頻譜上兩者位於相同的化學位移位置上而造成混淆，因而有頻譜 “回疊” 的現象發生。

圖二十二： 核磁共振波譜儀訊號處理流程。

圖二十三： 零填滿對頻譜解析度的影響。(a) 圖是取用 `si` = 0.5 · `td` 下的結果。由於資料點不夠，所以損失了頻譜解析度；(b) 圖是取用 `si` = `td` 下的結果。由於資料點足夠，所以頻譜解析度未損失；(c) (d) 圖分別是取用 `si` = 2 · `td` 及 `si` = 8 · `td`下的結果。雖然資料點過多，但是頻譜解析度並未因此增加。

圖二十四： 不同視窗函數下所獲得不同靈敏度與訊號解析度的節果。

圖二十五： 向前式線性預測的示意圖。左方是一個被截斷 (truncated) 的 FID 數據點 (共 TD 個)。中央的部分是使用線性預測技術所推測出 “可能” 的 FID 部分。右方是前述的零填滿資料點。

圖二十六： 零次項與一次項的相位校正應用實例。

圖二十七： 由 XWINNMR for NT 版所獲得的 NMR 圖譜可以藉由 “Copy-and-Paste” 的方式予以輸出至支援 Microsoft Office 的相關軟體 (CorelDraw、Word、PowerPoint、Excel、FrameMaker、Alchemy

2000、Adobe Illustrator、ChemDraw …)，並且可以使用磁片作為小型圖譜的儲存以及使用硬碟、ZIP 或是 MO 片作為大量資料的備份。

圖二十八： (a) 單獨一個 Gaussian 脈衝；(b) 不同頻率偏移值磁矩受 Gaussian 脈衝時演化的路徑；(c) 不同頻率偏移值磁矩受 Gaussian 脈衝時的頻率對應圖；(d) 一個 512 usec 的 G3 脈衝 (由三個 Gauss 脈衝所組合而成)；(e) 該 G3 脈衝對於不同頻率偏移值磁矩的 Z 方向影響圖。

圖二十九： (a) 假設具有三個互相具有 J-耦合作用的自旋-1/2 系統在經歷了一個選擇性脈衝的激發作用於 COSY 脈衝程序下以 NMRSIM 所模擬出的一維 COSY 結果；(b) 上述系統的二維 COSY 實驗模擬圖。

圖三十： XWINPLOT 與其它應用軟體資料傳遞的相關圖。

圖三十一： 一個 BRUKER 探頭的圖片。(右) 當內層線圈用於氫核偵測時，此探頭稱之為反式探頭 (inverse probehead)；(左) 當內層線圈用於非氫的原子核 (或稱為 X 原子核) 的偵測時，稱此探頭為標準探頭 (normal probehead)。

圖三十二： Cryoprobe 的示意圖。

圖三十三： BRUKER 公司特殊設計的 digital filtering 與 oversampling。

圖三十四： 磁場梯度的示意圖。除了超導磁鐵本身所產生的外加靜磁場 B_0 之外，磁場梯度線圈會在不同的空間位置上再附加一個不同強度的額外小磁場。因此在磁場梯度作用期間，不同空間位置上的相同官能基原子核亦具有不同的 Larmor 進動速率。

圖三十五： 具磁場梯度的 HMBC 脈衝程序及同調轉移 (coherence transfer) 示意圖。

圖三十六： BRUKER Ultra-Shield 磁鐵的磁場逸散情形非常小，因此兩個 300 MHz 的磁鐵可十分接近而不會互相干擾，如此可增加空間的有效利用率。

圖三十七： 傳統磁鐵與 BRUKER Ultra-Shield 磁鐵的 5-高斯 逸散場半徑比較圖。

圖三十八： BRUKER *AVANCE* NMR 的模組化示意圖。所有的控制單元像 ASU (Amplitude control and Setting Unit)、CCU (Communication Control Unit)、FCU (Frequency Control Unit)、GCU (Gradient Control Unit)、RCU (Receiver Control Unit)、TCU (Time Control Unit) 等皆已模組化。

圖三十九： 單相位偵測 (上) 與四相位偵測 (下) 示意圖。在單相位偵測方式中由於無法以該參考軸 (X’) 來區分此兩種頻率，所以做法是將參考軸移向比此兩頻率都低的頻率參考軸。如此一來該兩種頻率與新的參考軸就具有不同的頻率差值，也因此得以被區分。在四相位偵測方式中，同時以 X’ 與Y’ 軸上的分量來作為區分之用。職是之故，在四相位偵測方式中其頻譜寬度只需要是

單相位偵測方式的為的 0.5 倍即可。

圖四十： 時域空間 f(t) 中的一個 10 usec 脈衝所對應的頻率區間 F(ω)。

圖四十一： (左) 方波脈衝與其對不同頻率偏差值的影響；(中) Sinc 脈衝與其對不同頻率偏差值的影響；(右) E-BURP2 脈衝與其對不同頻率偏差值的影響；

圖四十二： 1000 usec E-BURP2 脈衝對 –1000 至 1000 Hz 頻率區間的影響示意圖. (a) 經過脈衝後 X 方向磁矩與不同頻率偏差值之間的關係圖；(b) 不同頻率受 E-BURP2 脈衝影響的磁矩演化情形示意圖；(c) (d) (e) 則分別是不同頻率磁矩在 X、Y、Z 方向的演化的投影量示意圖。

圖四十三： 同核種二維譜實驗依圖四十二混合期之分類圖示。

附錄三 ： 表列 (Table list)

表一： 常用的寬頻組合式去耦合脈衝 (CPD) 特性表。

表二： 常用實驗的參數檔名範例。

表三： 常用原子核的化學位移範圍值及其標準樣品

表四： 異核二維譜實驗的相對靈敏度比較。Direct observation 是傳統舊式的異核二維譜實驗方法；(Direct + Gradient) 是配備磁場梯度的改良式傳統實驗：(Inverse correlation) 是以反式探頭測量的異核二維譜實驗：配合反式探頭與磁場梯度的 (Inverse + Gradient) 實驗可獲得最大的靈敏度。

表五： 在一般最大的取樣速率 $BW_{sample} = 200$ KHz 之下，而一個典型的氫譜其譜寬不大於 $BW_{eff} = 10$ KHz 之下，動力範圍受過量取樣的增加值等於 $(BW_{sample}/BW_{eff})^{1/2}$。

表六： C13、DEPT-90、DEPT-135 實驗結果與碳的級數關係表。

表七： t_1 noise 產生的因素及抵消其效應的解決方式

表八： HSQC、HMQC、HMBC 的反式實驗在準備期與混合期的程序。

附錄四 ： 術語編彙